



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Análisis de la distribución de flujo
metabólico para la síntesis de ácido
micólico en *Mycobacterium
tuberculosis*, aislado clínico UT205**

Juan Felipe Muñoz Rengifo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2017

Análisis de la distribución de flujo metabólico para la síntesis de ácido micólico en *Mycobacterium tuberculosis*, aislado clínico UT205

Juan Felipe Muñoz Rengifo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Biotecnología

Director:

Rigoberto Ríos Estepa, PhD

Línea de Investigación:

Ingeniería Metabólica

Grupo de Investigación:

Biotecnología Industrial

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia

2017

A la memoria de mis abuelos, María Mercedes Arias viuda de Muñoz, Antonio María Rengifo Guisao y Rosa Emilia Bedoya de Garces

"I don't know anything, but I do know that everything is interesting if you go into it deeply enough"

-Richard Feynman

"The greatest barrier to success is the fear of failure"

-Sven Goran Eriksson

Agradecimientos

Agradezco padres, a mis hermanos y amigos por el apoyo incondicional proporcionado, la motivación constante y su presencia durante todo este proceso.

Deseo hacer notable el apoyo de mi tutor Rigoberto Rios Estepa, quien a través de sus enseñanzas y consejos ha logrado que crezca como persona y como profesional, además de hacer posible el correcto desarrollo de este proyecto de investigación.

Por último deseo agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, al Posgrado en Ciencias - Biotecnología y a todos los profesores que contribuyeron con mi formación. De igual manera quiero extender mis agradecimientos al grupo de Bioprocesos de la Universidad de Antioquia y a los compañeros que de uno u otra manera colaboraron con el correcto desarrollo del proyecto.

Resumen

En Colombia cada año se reportan más de once mil nuevos casos de tuberculosis, indicando que esta enfermedad aún continúa siendo un serio problema para la salud. La bacteria causante de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), presenta una diversidad genética amplia con diferencias fenotípicas significativas entre aislados clínicos; esta diversidad y el cambio que se da en el metabolismo durante las fases de infección son, entre otras, las razones que han dificultado la completa erradicación de la enfermedad. En el presente estudio se aplicaron técnicas de evaluación de flujo metabólico a lo largo de las diferentes rutas bioquímicas involucradas en la síntesis de ácido micólico, con el fin de contribuir a obtener un mejor entendimiento de la actividad bioquímica de la bacteria durante el proceso infeccioso. La metodología usada involucró el desarrollo de un modelo matemático a partir de la identificación de las principales rutas metabólicas que el organismo usa para defenderse de los efectos adversos del medio; el modelo fue inicialmente desarrollado para considerar el metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y posteriormente fue extendido para considerar el metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis* aislado clínico UT205. El modelo metabólico consideró 82 metabolitos en 100 reacciones y fue usado para realizar análisis de balance de flujo a partir de los cuales se generaron algunas hipótesis respecto de cómo *M. tuberculosis* UT205 cambia la distribución de sus flujos metabólicos para suplir algunas deficiencias ocasionadas por la presencia de deleciones genéticas. El modelo generado en este trabajo presenta grado de robustez aceptable que de manera preliminar representa la actividad metabólica de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los resultados encontrados en este trabajo permiten tener un primer acercamiento al conocimiento de las características metabólicas de la cepa UT205; concretamente el comportamiento de las reacciones afectadas por la ausencia del gen Rv1997 y que diferencian a la cepa UT205 de la cepa de referencia. Sin embargo, es necesario enriquecer el modelo con mayor información sobre genes, enzimas y variaciones en rutas metabólicas presentes en la cepa UT205, de manera que se obtenga un modelo más representativo del comportamiento real del aislado clínico.

Palabras claves: Tuberculosis, flujos metabólicos, diversidad genética, ácido micólico.

Abstract

[Title: Metabolic flux analysis of mycolic acid pathway, *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate UT205]

Every year in Colombia, there are more than eleven thousand new cases of tuberculosis, indicating that this disease remains as a serious health problem. The bacterium that causes tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), has a broad genetic diversity with significant phenotypic differences between clinical isolates; this diversity and the metabolic changes that occurs during infection are some of the reasons that hinders a full eradication of the disease. This work seeks to apply the metabolic flux analysis (MFA) strategy to study the biochemical pathways involved in the synthesis of mycolic acid in *M. tuberculosis*. This approach provided a better understanding of the cell performance during the infectious process and allowed to compare the metabolic capabilities of the clinical isolate *M. tuberculosis* UT205 with regard to the reference strain *M. tuberculosis* H37Rv. For this, it was constructed a representative model of the metabolic pathways of the pathogenic bacteria *M. tuberculosis* H37Rv involving 82 metabolites in 101 reactions; the proposed metabolic map was extended to consider the metabolism of the clinical isolate UT205. Flux balance analysis was performed so as to generate various hypotheses regarding how *M. tuberculosis* UT205 changes its flux distribution in order to overcome some limitations caused by the presence of genetic deletions. The proposed model shows an acceptable robustness and can be used as a preliminary tool for representing the metabolism of *M. tuberculosis*.

The results allowed us to acquire, as a first approach, a preliminary understanding of the metabolic characteristics of the clinical isolate; specifically, the flux variability caused by the absence of the gen Rv1997 that differentiates UT205 from the reference strain. It is necessary to improve the model with further information regarding genes, enzymes and variations in metabolic pathways, present in the clinical isolate, thus rendering an improved metabolic model.

Keywords: Tuberculosis, Metabolic flux, genetic diversity, mycolic acid.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
1. Marco teórico	5
1.1 Tuberculosis.....	5
1.1.1 Infección.....	6
1.1.2 Tratamiento.....	6
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
1.2.1 Generalidades.....	7
1.2.2 Genética.....	8
1.2.3 Biogeografía de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
1.2.4 Patogenicidad.....	9
Ácido micólico.....	10
Cambios en el metabolismo.....	14
Rutas asociadas a las fuentes de carbono.....	15
1.3 Aproximación sistémica.....	15
1.3.1 Análisis de balance de flujos (FBA).....	18
1.4 Herramientas para el estudio del metabolismo celular.....	21
1.4.1 Software disponible para el análisis de flujos metabólicos en <i>M. tuberculosis</i>	23
1.4.2 Bases de datos disponibles para el estudio de <i>M. tuberculosis</i>	26
2. Aproximación sistémica al metabolismo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
2.1 Metodología.....	33
2.1.1 Construcción del modelo metabólico - Abstracción.....	33
2.1.2 Construcción del modelo metabólico – Formulación.....	34
2.1.3 Validación.....	35
2.1.4 Ensayos de Simulación.....	36
Estados metabólicos extremos.....	36
Eventos metabólicos.....	36
Robustez del modelo.....	37
Modos Elementales (MEs).....	37
Análisis de variabilidad de flujo (Flux Variability Analysis, FVA).....	38
2.2 Extensión del modelo al metabolismo de <i>M. tuberculosis</i> UT205.....	39
2.2.1 Análisis de robustez.....	39
3. Resultados y discusión	43
3.1 Validación.....	43
3.1.1 Estados metabólicos extremos.....	46

3.1.2	Simulación de diferentes eventos metabólicos	47
3.1.3	Robustez del modelo.....	49
3.1.4	Modos Elementales (MEs)	53
3.1.5	Análisis de variabilidad de flujo (Flux Variability Analysis, FVA)	55
3.2	Extensión del modelo matemático para representar el metabolismo de <i>M. tuberculosis</i> , aislado clínico UT205.	56
3.2.1	Análisis de distribución de fluxes	57
	Fructosa bifosfato aldolasa.....	58
	Fructosa 1,6 bifosfatasa	58
	Enolasa	59
	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	59
	Enzima málica (mez).....	60
	Isocitrato deshidrogenasa	60
	Alfa-cetoglutarato ferredoxin oxidoreductasa.....	61
	Succinil-CoA sintetasa.....	62
	Malato sintasa	62
	Ribulosa fosfato 3 epimerasa	63
	Transcetolasa.....	63
4.	Conclusiones y recomendaciones	65
4.1	Conclusiones	65
4.2	Recomendaciones	66
A.	Anexo: Modelo de reacciones metabólicas <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.	69
B.	Anexo: Eventos metabólicos extremos.....	73
C.	Anexo: Análisis de robustez	75
D.	Anexo: Abreviación metabolitos.....	99
E.	Anexo: Análisis de variabilidad de flujo.....	101
	Bibliografía	105

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura filogenética y distribución geográfica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , definida por polimorfismo de secuencias largas (<i>large sequence polymorphisms</i> ; LSP). Principales linajes de <i>M. tuberculosis</i> : ● Indo-Océanico, ● Este-Asia, ○ Este-África-India, ● Euro-Americano, ⊗ Africa-Oeste1, ⊕ Africa-Oeste2 (Gagneux et al. 2006).....	9
Figura 1-2: Estructura química de ácidos micólicos obtenidos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Takayama et al. 2005).....	11
Figura 1-3: Mapa de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de ácido micólico en <i>M. tuberculosis</i> (Raman et al. 2005).	12
Figura 1-4: ■ Variaciones en el ciclo de ácidos tricarbóxicos en <i>M. tuberculosis</i> . ■ Indica las rutas utilizadas durante el crecimiento en ácidos grasos como única fuente de carbono; ■ indica las rutas utilizadas en conjunto con la β-oxidación y comunes a las dos fases de crecimiento.	17
Figura 2-1: Mapa metabólico simplificado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41
Figura 3-1: Porcentaje de participación de las reacciones del modelo en las diferentes redes metabólicas	44
Figura 3-2: Validación del modelo por comparación con la literatura. a) mapa metabólico simplificado de <i>M. tuberculosis</i> ., b) mapa de flujos metabólicos obtenidos por ¹³ C-MFA (Beste et al. 2011). Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glicerol y se le otorgo arbitrariamente el valor de 100 mmol g-DW ⁻¹ h ⁻¹ . Glicolisis/Gluconeogénesis y Pentosas fosfato (cian), rutas anapleróticas (azul), el ancho de cada línea es proporcional al valor de flujo correspondiente.....	48
Figura 3-3: Validación del modelo por inhibición de la mega-proteína FASII por el fármaco Pirazinamida. Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glicerol y se le otorgo arbitrariamente el valor de 100 mmol g-DW ⁻¹ h ⁻¹	50
Figura 3-4: Validación del modelo por inhibición de InhA en el complejo proteico FASII por los fármacos Isoniazida y Etionamida. Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glicerol y se le otorgo arbitrariamente el valor de 100 mmol g-DW ⁻¹ h ⁻¹	51
Figura 3-5: Análisis de robustez. Formación de biomasa a partir del consumo de glucosa (línea azul); Formación de biomasa a partir de consumo de glicerol (línea verde) los valores de la gráfica se encuentran en mmol g-DW ⁻¹ h ⁻¹ para el sustrato y g-DW para la biomasa	52

Figura 3-6: Histogramas longitud de las rutas para los modos elementales suministrando como fuente de carbono A) Glucosa, B) Glicerol, C) Ácidos grasos y D) todas las anteriores fuentes de carbono.....	54
Figura 3-7: Participación de las reacciones para todos los sub-modelos.....	55
Figura B1: Evento extremo optimizando la formación de biomasa. Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glicerol y se le otorgo arbitrariamente el valor de $100 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$	73
Figura B2: Evento extremo optimizando la formación de biomasa. Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glucosa y se le otorgo arbitrariamente el valor de $100 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$	74

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Sumario de varios algoritmos utilizados en la simulación del metabolismo de <i>M. tuberculosis</i> . Abreviación de los algoritmos: FBA, flux balance analysis; FVA, flux variability analysis; SR-FBA, steady-state regulatory flux balance analysis; PROM, probabilistic regulation of metabolism.....	20
Tabla 1-2: Herramientas computacionales para el modelado del metabolismo celular.	22
Tabla 2-1: Enzimas dependientes de cationes metálicos en el mapa propuesto de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
Tabla 3-1: Computo de modos elementales en cuatro modelos propuestos.....	53
Tabla A1: Modelo de reacciones metabólicas prevista para el modelo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	69
Tabla C2: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Fructosa bifosfato aldosa	75
Tabla C3: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Enolasa.....	77
Tabla C4: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Fosfoenol piruvato carboxiquinasa.....	79
Tabla C5: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Malato oxidoreductasa (mez).....	81
Tabla C6: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Isocitrato deshidrogenasa.....	83
Tabla C7: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Alfa-cetoglutarato ferredoxin oxidoreductasa.....	85
Tabla C8: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Succinil-CoA sintetasa	87
Tabla C9: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Malato sintasa.....	89
Tabla C10: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Ribulosa fosfato 3 epimerasa	91
Tabla C11: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Transcetolasa, $R5P + X5P \rightleftharpoons G3P + S7P$	93
Tabla C12: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Transcetolasa, $X5P + E4P \rightleftharpoons F6P + G3P$	95
Tabla C13: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Transcetolasa....	97
Tabla D1: Listado de la abreviación utilizada para los metabolitos.....	99
Tabla E1: Flujos máximos y mínimos para obtenidos mediante FVA para cada una de las reacciones del modelo metabólico.....	101

Lista de anexos

	Pág.
Anexo A: Modelo de reacciones metabólicas <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	69
Anexo B: Eventos metabólicos extremos	73
Anexo C: Análisis de robustez	75
Anexo D: Abreviación metabolitos	99
Anexo E: Análisis de variabilidad de flujo	101

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO), ha clasificado la tuberculosis (TB) como la segunda causa de muerte en el mundo derivada de una enfermedad infecciosa; TB es responsable de 8.6 millones de casos de infección cada año y aproximadamente 1.3 millones de muertes incluyendo las muertes por TB en personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana, VIH (WHO 2015).

La bacteria causante de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, presenta una diversidad genética que da como resultado diferencias fenotípicas significativas entre aislados clínicos. Experimentalmente se ha demostrado que *Mycobacterium tuberculosis* exhibe una estructura biogeográfica donde diferentes linajes de cepas se encuentran asociadas a regiones geográficas específicas (Gagneux et al. 2006; Brown et al. 2010; Mokrousov et al. 2005; de Jong et al. 2008). Las variaciones genotípicas encontradas en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de estas poblaciones geográficamente diferentes, la baja o nula efectividad de los actuales fármacos frente a infecciones persistentes, la necesidad de un tratamiento prolongado para la eliminación de la infección (4 a 6 meses) y la aparición de cepas multi-resistentes, entre otras causas, han dificultado la completa erradicación de la enfermedad en varias regiones del mundo.

Existen diversas razones que dificultan el desarrollo de nuevos fármacos para combatir la Tuberculosis, entre ellas, quizá la más importante, está el cambio en el metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis* durante el proceso de infección. En esta fase, la bacteria utiliza rutas bioquímicas alternas para el crecimiento, las rutas de la β -oxidación, el ciclo metilcitrato, la ruta del metil-malonil y la ruta GAS (la ruta del glioxilato, rutas anapleróticas y succinil CoA), descrita por Beste (2011); la actividad de estas rutas se encuentra asociada al nivel de virulencia presentado por la bacteria (Muñoz-Elías & McKinney 2005; Muñoz-Elías et al. 2006; Beste et al. 2011).

La complejidad del metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis* conlleva dificultades y retos para un mejor entendimiento, especialmente cuando se emplea un enfoque de tipo reduccionista, en el que cada parte del sistema celular, incluso una reacción particular, se estudia individualmente. Dada tal complejidad, se hace necesario recurrir a un enfoque sistémico que permita estudiar las características bioquímicas de la bacteria desde una visión más holística, en donde se identifiquen cada uno de los componentes celulares y sus posibles interacciones, y se pueda observar como los cambios o posibles perturbaciones afectan el sistema celular.

Diversos avances científico-tecnológicos (Weckwerth 2003) han facilitado la obtención de secuencias genómicas completas y la reconstrucción de redes metabólicas; de igual forma, han permitido que la aproximación reduccionista al estudio de la célula sea complementada con una visión más holística de la actividad metabólica constituyendo un gran avance en el entendimiento de los procesos bioquímicos. Estos avances permiten identificar puntos específicos en la red metabólica que puedan sugerir una estrategia y/o procedimientos experimentales para el desarrollo de nuevos medicamentos y/o tratamientos.

Entre estas nuevas ciencias y tecnologías se encuentra la Metabolómica, la cual puede ser considerada como una tecnología de análisis que busca identificar y cuantificar todos los metabolitos presentes en una muestra biológica. La Metabolómica hace uso de varias técnicas analíticas entre las cuales se incluyen la resonancia magnética nuclear y la espectroscopia de masas, herramientas que generalmente son combinadas con diferentes técnicas de separación incluyendo la cromatografía de gases, cromatografía líquida y electroforesis capilar (Lee et al. 2006). Con el desarrollo de la Metabolómica ha sido posible generar perfiles de la producción de metabolitos en sistemas biológicos microbianos (Smedsgaard & Nielsen 2005), plantas (Fiehn et al. 2000; Roessner et al. 2000) y humanos (Jansen et al. 2004). Los grandes avances en Metabolómica han permitido el surgimiento de nuevas áreas de las ciencias encaminadas al estudio de los procesos metabólicos. Así, el análisis de flujos metabólicos (*Metabolic Flux Analysis*, MFA) emerge como una alternativa para el estudio del metabolismo a escala global, permitiendo una aproximación al modelado del metabolismo celular sin la necesidad de considerar mecanismos detallados, propios de la cinética enzimática; el análisis de flujos

metabólicos aprovecha el hecho de que la estequiometría de las reacciones metabólicas no es organismo-dependiente (Varma & Palsson 1994; Colijn et al. 2009).

El análisis de flujos metabólicos es un método que utiliza la estequiometría universal de las reacciones para predecir la capacidad de una red metabólica para producir un metabolito de interés; esta técnica ha sido aplicada satisfactoriamente al estudio de las capacidades metabólicas de diversas especies (Raman et al. 2005; Manish et al. 2007; Kruger & Ratcliffe 2009; Matsuda et al. 2007; Niklas et al. 2010).

Otras metodologías para la determinación de flujos metabólicos incluyen el análisis del balance de flujos (*Flux Balance Analysis*, FBA) (Lee et al. 2006), el análisis de flujos metabólicos usando sustratos marcados isotópicamente (^{13}C -*Metabolic Flux Analysis*, ^{13}C -MFA) (Zamboni et al. 2009) y el desarrollo de modelos a escala genómica (Becker & Palsson 2005; Borodina et al. 2005; Mizrahi & Andersen 1998). Por lo general, estos métodos se basan en la suposición de estado estable, es decir, los cambios (respecto del tiempo) en las concentraciones de metabolitos intermediarios son insignificantes (Niklas et al. 2010; Stephanopoulos et al. 1998); esta simplificación de estado estacionario es válida si se tiene en cuenta el rápido equilibrio que se establece en la concentración de los metabolitos (segundos) respecto del tiempo necesario para que ocurra la regulación génica (varios minutos). De igual manera, se han desarrollado técnicas para buscar representar el comportamiento de los procesos metabólicos en estado transiente (*Dynamic Metabolic Flux Analysis*, DMFA) (Leighty & Antoniewicz 2011; Antoniewicz 2013).

Diversos estudios han demostrado que la reconstrucción y análisis de redes metabólicas a escala genómica y el MFA, pueden ser usados como métodos efectivos para evaluar e identificar puntos de control que lleven al desarrollo de drogas altamente específicas, que perturben el metabolismo de microorganismos patógenos controlando su crecimiento o eliminándolos completamente (Beste et al. 2007; Oberhardt et al. 2008; Oberhardt et al. 2010). La pertinencia de un modelo matemático, representativo de la actividad metabólica, es significativa si se tiene en cuenta el carácter geográfico-dependiente del patógeno y la continua aparición de cepas altamente resistentes al tratamiento con antibióticos.

El grupo de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Antioquia en conjunto con el Grupo de Inmunología celular e Inmunogenética y el Centro Nacional de Secuenciación Genómica y el Grupo de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional, trabajan en el estudio de la actividad metabólica de *Mycobacterium tuberculosis* durante los procesos de infección, mediante la reconstrucción a escala genómica y posterior análisis de la red metabólica del aislado clínico de *M. tuberculosis* UT205, cuyo genoma ha sido secuenciado y publicado (Isaza et al. 2012). El presente proyecto busca generar un modelo estequiométrico que permita estimar la distribución de flujos metabólicos y, a partir de ellos, evaluar la capacidad/características metabólicas del microorganismo y la síntesis de ácido micólico, principalmente durante los procesos de infección.

1. Marco teórico

1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) considerada en 1993 problema de salud pública por la Organización mundial de la salud (*World Health Organization*, WHO) es, a nivel mundial, una de las diez primeras causas de muerte; se estima que en el 2015 se presentaron, a nivel mundial, 10.4 millones de nuevos casos de infección de TB, y 1.8 millón de muertes en personas (WHO 2015).

En Colombia, en el año 2015, se presentaron cerca de 2.1 muertes por cada 100.000 habitantes, con una incidencia de casos de infección, en todas sus formas, de 31 casos por 100.000 habitantes. Para el mismo año, se notificaron 12.749 nuevos casos de TB, lo cual indica que sigue siendo un serio problema de salud pública (www.who.int/tb/data).

La tuberculosis, causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), principalmente afecta los pulmones (TB pulmonar), pero puede afectar otras partes del organismo (TB extrapulmonar); esta enfermedad se transmite cuando personas con TB pulmonar expelen la bacteria, por ejemplo al toser (WHO 2015). La proporción de personas infectadas con la bacteria que logran desarrollar la enfermedad es relativamente pequeña; sin embargo, está probabilidad aumenta en personas con deficiencias en el sistema inmune, como ocurre en casos de infección por VIH, desnutrición o diabetes, o en quienes consumen tabaco (WHO 2015).

Cuando la enfermedad tuberculosa se presenta, los síntomas (tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, etcétera) pueden ser leves por muchos meses. Como resultado, los pacientes tardan en buscar atención médica y en el intermedio transmiten la bacteria a otros. A lo largo de un año, un enfermo tuberculoso puede infectar a unas 10 a 15 personas por contacto directo. Si no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos terceras partes de los enfermos tuberculosos mueren.

1.1.1 Infección

La tuberculosis en la mayoría de los casos sigue un patrón general. El primer estadio inicia con la inhalación del bacilo tuberculoso y su implantación en los alvéolos; después, la bacteria se disemina por circulación linfática hacia los nódulos linfáticos del pulmón (Smith 2003); los macrófagos alveolares fagocitan al bacilo formando el denominado *Complejo Primario* o de *Ghon*. En este estadio, la destrucción de la micobacteria depende de que la capacidad microbicida intrínseca de los fagocitos del huésped supere a los factores de virulencia de la micobacteria. El segundo estadio dura cerca de tres meses (Smith 2003); algunas veces las lesiones tuberculosas se licuan y forman cavernas tuberculosas llenas de aire. A partir de estas cavidades, la bacteria se puede diseminar por la circulación hematogena hacia diversos órganos, incluyendo otras partes del pulmón; para este tiempo, en muchos individuos la enfermedad aguda y fatal, puede presentarse en forma de tuberculosis meníngea o miliar (tuberculosis diseminada) (WHO 2015).

1.1.2 Tratamiento

El tratamiento de pacientes tuberculosos plantea diversas dificultades: la bacteria causante de la enfermedad sólo es sensible a los fármacos bactericidas cuando está activa metabólicamente y en replicación. Durante este periodo se trata con una combinación estándar de medicamentos (Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol) los cuales, en función de su eficiencia y tolerabilidad, son denominados fármacos de primera línea (García Ramos et al. 2003). La duración del tratamiento en esta fase es de seis meses, tiempo durante el cual se supervisa y apoya al paciente. Si no se proporciona supervisión y apoyo, el cumplimiento terapéutico puede ser difícil y, como consecuencia, la infección puede propagarse.

En algunos casos, y durante periodos indefinidos pueden permanecer subpoblaciones de bacterias que sólo se activan de modo transitorio durante lapsos muy cortos, al igual que bacterias resistentes a los fármacos de primera línea. Para estos casos o como alternativa en situaciones clínicas aisladas, se utilizan medicamentos de segunda línea. Entre estos fármacos se encuentran las Fluorquinolonas (Ciprofloxacina, Levoflaxina), Polipeptidos (Capreomicina, Viomicina), Tioamidas (Protionamida, Etionamida), Aminoglicosidos (Amicacina, Canamicina), medicamentos con actividad bactericida, y

medicamentos con acción bacteriostática como el ácido Paraaminosalicílico, Cicloserina, Clofazimina. Además de su acción sobre cepas resistentes a múltiples fármacos (*Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB*) y cepas ampliamente resistentes a fármacos (*extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB*), estos fármacos de segunda línea pueden tener efectos secundarios (como fiebre, insuficiencia renal y convulsiones) o pueden no estar disponibles en países no desarrollados (WHO 2010).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

1.2.1 Generalidades

Mycobacterium tuberculosis, es una especie bacteriana que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*; es un bacilo ligeramente curvo o recto (Prescott et al. 2001), intracelular obligado, aerobio, inmóvil con dimensiones de 1-4 x 0.3 x 0.6 μm (Brennan & Nikaido 1995), con carencia de actividad catalasa, capacidad de acumular niacina y reducir los nitratos a nitritos.

La pared celular de las micobacterias es distintiva y se encuentra asociada a la patogenicidad del microorganismo; la gran cantidad de lípidos le confieren a la pared características propias como hidrofobia, que es la tendencia que muestran las células a adherirse unas con otras durante su crecimiento en medios acuosos (Prescott et al. 2001). La pared micobacteriana se encuentra constituida por ácidos micólicos y arabinogalactano-peptidoglucano (mAGP) separada por un espacio periplásmico, confiriéndole un carácter hidrofóbico que la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática y resistente a muchos de los agentes antimicrobianos (Gorocica et al. 2005).

Mycobacterium tuberculosis obtiene su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono (como glucosa y glicerol). El aumento de la presión parcial de dióxido de carbono estimula su crecimiento y crece en medios simples con glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio (Lugo de la Fuente 2005). Forma colonias no pigmentadas y rugosas después de 14 a 28 días de incubación en medios de Löwenstein-Jensen o Middlebrook. Su crecimiento se propicia en una atmósfera de 5 a 10% de dióxido de carbono, pero sigue siendo lento, con un tiempo medio de generación

de 12 a 24 horas. También es resistente a la desecación, insensible a los detergentes catiónicos, pero no resiste el calor ni la radiación ultravioleta (Lugo de la Fuente 2005).

1.2.2 Genética

Los avances en las técnicas y en la tecnología para la secuenciación de ADN han permitido el estudio de microorganismos, que dadas las dificultades de trabajar con ellos y la falta de herramientas adecuadas por medio de la microbiología tradicional, no habían podido ser estudiados. En 1998, *The Institute for Genomic Research* y *The Sanger Center-Pasteur Institute consortium*, obtuvieron la secuencia completa del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Cole et al. 1998).

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* consiste de 4.4×10^6 pares de bases (pb) con un alto contenido de guanina y citosina, y contiene aproximadamente 4.000 genes. La anotación del genoma muestra que la bacteria posee características únicas. Más de 200 genes se encuentran relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y la β -oxidación; este gran número de enzimas puede encontrarse relacionado con la habilidad que posee *Mycobacterium tuberculosis* de crecer en los tejidos del huésped, donde probablemente los ácidos grasos sean la mayor fuente de carbono (Smith 2003). Otra de las características de *Mycobacterium tuberculosis* es la presencia de genes que codifican para familias de proteínas ácidas, Pro-Glu (PE) y Pro-Pro-Glu (PPE), localizadas en la pared y la membrana celular. Algunas de estas proteínas juegan un papel importante en la variación antigénica de *Mycobacterium tuberculosis* durante la infección (Smith 2003).

1.2.3 Biogeografía de *Mycobacterium tuberculosis*

La comunidad científica ha asumido que muchos de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* son esencialmente idénticos pero existe evidencia de que *M. tuberculosis* es genéticamente más diversa de lo que aparenta; la variabilidad presentada por la bacteria se puede traducir en diferencias fenotípicas significativas entre aislados clínicos (Gagneux & Small 2007; Kato-Maeda & Bifani 2001; Malik & Godfrey-Faussett 2005). Los estudios desarrollados por Gagneux han demostrado que la variabilidad entre linajes de cepas de *M. tuberculosis* se encuentran asociados a regiones geográficas particulares (Figura 1-1), las cepas de referencia H37Rv y H37Ra se encuentran dentro del linaje de

la cepa Euro-Americana (Gagneux et al. 2006; Gagneux & Small 2007; Mokrousov et al. 2005).

Son pocos los genomas de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* que se han publicado, la mayoría en Asia, Europa y América. Isaza (2012) reportaron las características genómicas de un aislado clínico Colombiano de *M. tuberculosis* UT205. La comparación de este genoma con el de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, muestra múltiples deleciones e inserciones de hasta miles de bases, y cambios en al menos un aminoácido en alrededor de 430 proteínas. Adicionalmente, este aislado clínico presenta una posición diferente para el elemento de inserción IS6110, y se caracteriza por una larga deleción del genoma de 3.6 kb, dando lugar a la pérdida y modificación de los genes del regulón *dosR*, Rv1996 y Rv1997.

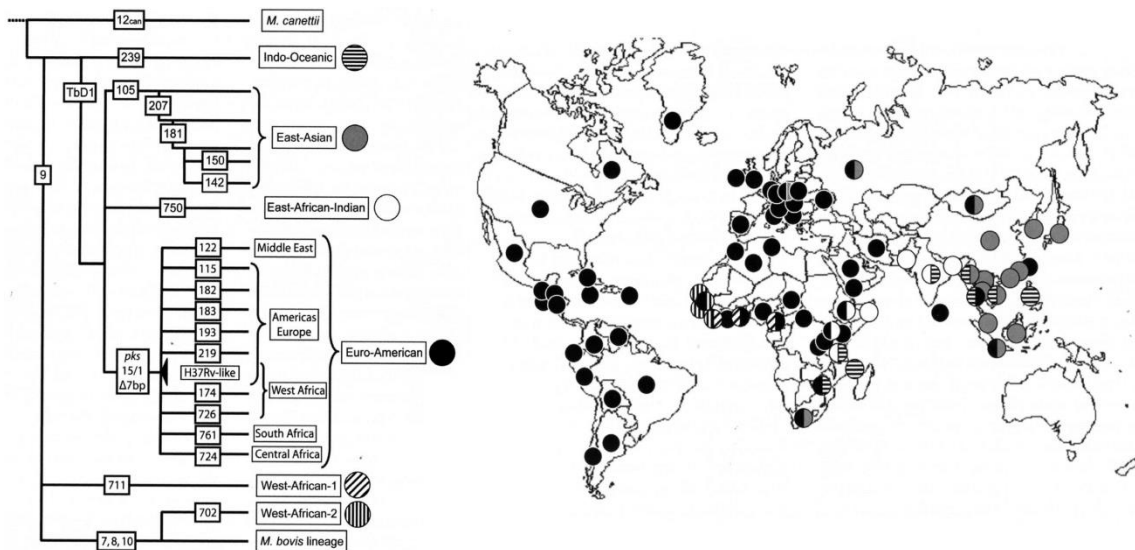


Figura 1-1: Estructura filogenética y distribución geográfica de *Mycobacterium tuberculosis*, definida por polimorfismo de secuencias largas (*large sequence polymorphisms*; LSP). Principales linajes de *M. tuberculosis*: ● Indo-Océanico, ● Este-Asia, ○ Este-África-India, ● Euro-Americano, ● Africa-Oeste1, ● Africa-Oeste2 (Fuente: Gagneux et al. 2006)

1.2.4 Patogenicidad

Lamentablemente aún no se conocen con claridad cuáles son los principales factores asociados al desarrollo de la patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta

micobacteria no posee los factores de virulencia clásicos que presentan otras bacterias como, por ejemplo, las toxinas producidas por *Corinebacterium diphteriae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cholerae*.

Entre los factores asociados a la patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis* que se han podido identificar, se encuentran algunos componentes de membrana, específicamente el ácido micólico, y cambios en el metabolismo que involucran la utilización de rutas alternas como medio de obtención de energía las cuales se activan dependiendo de la fuente de carbono. Dentro de estas rutas se encuentran la β -oxidación, el ciclo metilcitrato, la ruta del metil-malonil y la ruta GAS (Muñoz-Elías & McKinney 2005; Muñoz-Elías et al. 2006; Beste et al. 2011).

▪ Ácido micólico

Los ácidos micólicos son compuestos de alto peso molecular que pueden ser encontrados en especies de micobacteria. Los ácidos micólicos son ácidos grasos β -hidróxidos con una larga cadena lateral α -alquilo, donde la cantidad de carbonos en la cadena lateral varía según la especie de micobacteria (Steck et al. 1978). *M. tuberculosis* está caracterizada por tener un ácido graso muy hidrofóbico, de 54 a 63 carbonos, y una cadena lateral entre 22 y 24 carbonos; además, posee tres estructuras distintas de ácidos micólicos: α -micolato, metoxi-micolato y ceto-micolato, que se ilustran en la Figura 1-2.

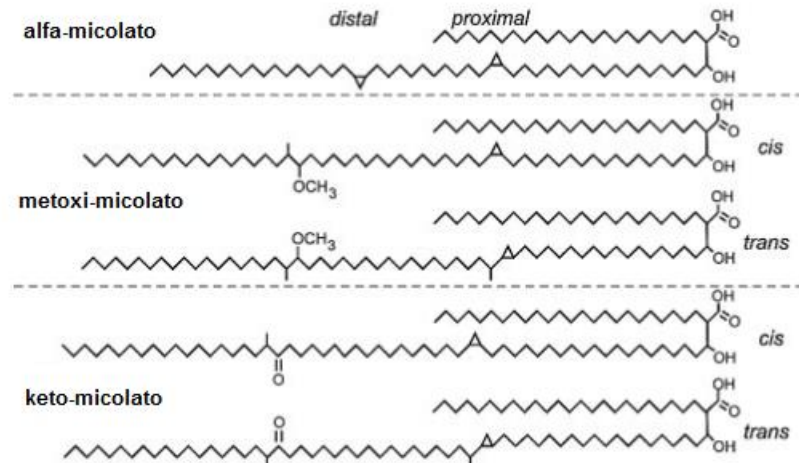


Figura 1-2: Estructura química de ácidos micólicos obtenidos de *Mycobacterium tuberculosis* (Fuente: Takayama et al. 2005)

Se ha demostrado que los ácidos micólicos se encuentran asociados al crecimiento y la virulencia presentada por *Mycobacterium tuberculosis* (Vander Beken et al. 2011; Dubnau et al. 2002; Vilchèze et al. 2000). El proceso de síntesis de ácidos micólicos constituye el blanco metabólico principal de las drogas de primera línea (Takayama et al. 1972; Raman et al. 2005).

Las rutas metabólicas y las enzimas involucradas en la síntesis de ácido micólico han sido reportadas en detalle por Takayama (2005) y Raman (2005); se puede considerar que la biosíntesis de los ácidos micólicos se encuentra constituida por cuatro subrutas: 1)

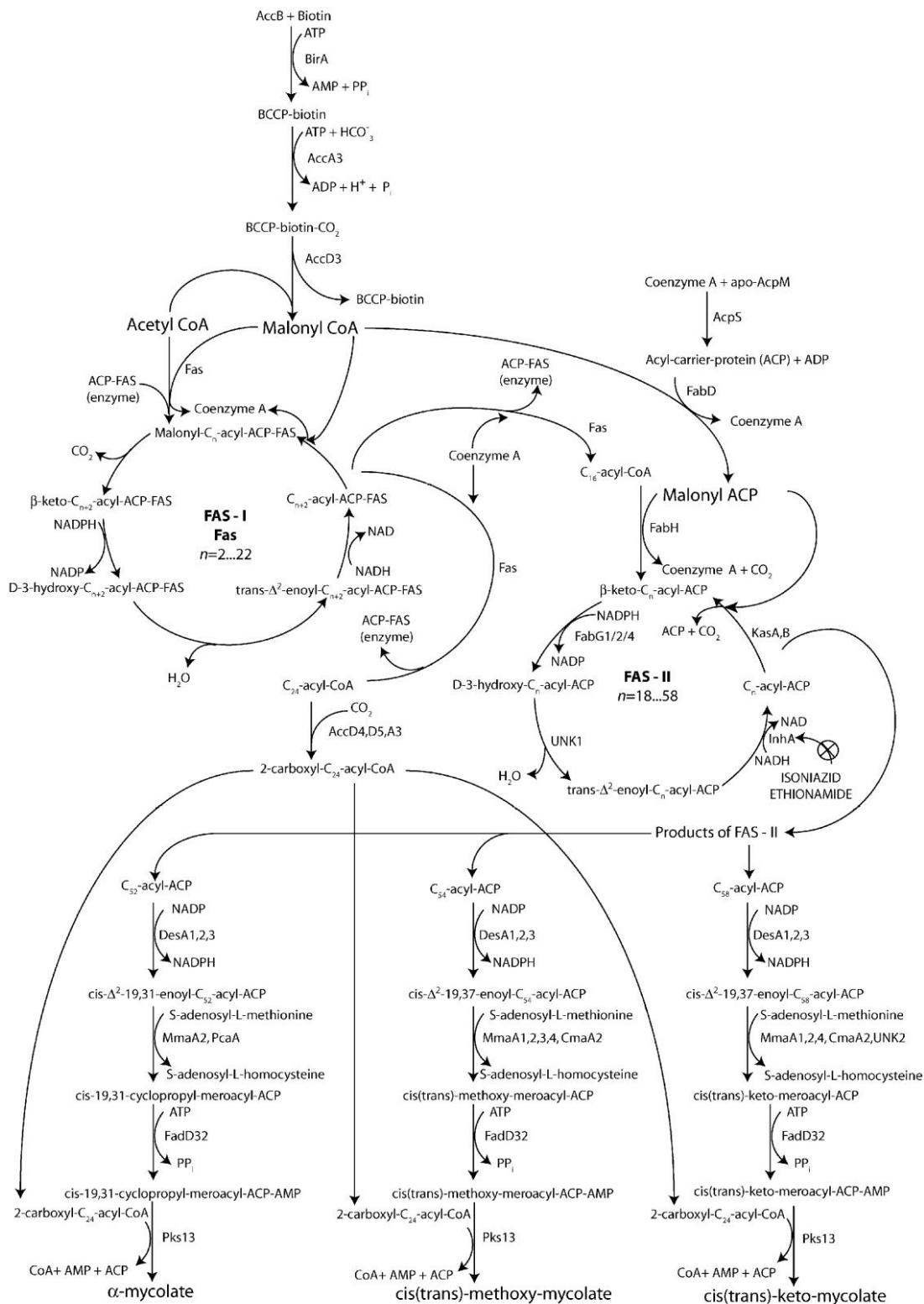


Figura 1-3: Mapa de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de ácido micólico en *M. tuberculosis* (Raman et al. 2005).

la producción de malonil-CoA, 2) la síntesis de nuevos ácidos grasos por la ruta FASI (*fatty acid synthase-I*), 3) la elongación de los ácidos grasos provenientes de FASI por FASII (*fatty acid synthase-II*), y 4) la condensación de los productos de FASI y FASII en ácidos micólicos (α -micolato, metoxi-micolato y ceto-micolato) (Figura 1-3).

En la síntesis de ácidos micólicos se destacan principalmente dos sistemas enzimáticos separados, FASI y FASII. FASI es una mega-enzima con multifuncionalidad que se encuentra principalmente en células eucarióticas y posee como función principal la síntesis *de novo* de cadenas de ácidos grasos (entre 16 y 24 carbonos); dentro de los dominios enzimáticos necesarios para la síntesis de los ácidos grasos se encuentran: acetiltransferasa, enoil reductasa, deshidratasa, malonil/palmitoil transferasa, ACP (Acetyl Carrier Protein), β -cetoacil reductasa y β -cetoacil sintetasa (Schweizer & Hofmann 2004). Todos los intermediarios generados por FASI permanecen unidos a la enzima durante el proceso de elongación; el paso de estos intermediarios entre sitios catalíticos se da por transacetilación dentro de la misma enzima (Bhatt et al. 2007).

El sistema de síntesis de ácidos grasos FASII es un complejo multi-proteico que posiblemente adopta una arquitectura similar a la mega-enzima FASI (Cantaloube et al. 2011). Entre las enzimas que conforman FASII se encuentran: mtFabH inicia la elongación y sirve de puente entre los sistemas FASI y FASII, β -cetoacil-AcpM reductasa (MabA, FabG1), β -hidroxiacil-AcpM deshidratasa y enoil-AcpM reductasa (InhA), y KasA/KasB (β -cetoacil-AcpM sintetasa) encargadas de elongar las cadenas de ácidos grasos. FASII no es capaz de generar cadenas de ácidos grasos por sí sola, en cambio alarga las cadenas formadas por FASI generando cadenas de entre 50 y 60 carbonos (Bhatt et al. 2007).

Las drogas que tienen como blanco metabólico los sistemas de síntesis de ácidos grasos son pocas; entre estas se encuentran la Pirazinamida, Isoniacida y Etionamida. La Pirazinamida es una prodroga que requiere de una enzima bacteriana (piramidasa) para su conversión a su forma activa, el ácido Pirazinoico. El fármaco inhibe la mega-proteína FASI pero esta no es su principal blanco (Zimhony et al. 2000; Boshoff et al. 2002); el efecto antibacteriano se genera por la acumulación de ácido pirazinoico el cual interfiere con la funcionalidad de la membrana, alterando el potencial de membrana y la producción de energía (Zhang & Mitchison 2003); además, se une a la subunidad ribosomal 30S (RpsA) afectando la *trans*-translación (Shi et al. 2011). La Isoniacida es

una prodroga que es activada por una catalasa-peroxidasa (KatG) (Lei 2000), la Isoniacida (al igual que la Etionamida) afectan la multi-proteína FASII más precisamente la enzima enoil-AcpM reductasa, conocida como InhA. Estos dos fármacos inhiben la producción de ácidos micólicos y generan una acumulación de los productos provenientes de FASI, llevando a la lisis celular (Takayama et al. 1972; Vilchère et al. 2000). La Isoniacida durante la fase de crecimiento rápido de la micobacteria presenta características bactericidas, en cambio durante el crecimiento lento actúa como agente bacteriostático (Ahmad et al. 2009).

▪ Cambios en el metabolismo

Las diferentes fases clínicas exhibidas por *Mycobacterium tuberculosis* pueden ser resumidas a dos estados fisiológicos: un estado activo que involucra un rápido crecimiento de la bacteria, y un estado de latencia caracterizado por un bajo crecimiento o una baja replicación. Estos dos estados se encuentran ligados a las adaptaciones que sufre la bacteria al ser blanco del sistema inmunológico del huésped; los macrófagos son la primera línea de defensa del sistema inmune contra microorganismos patógenos y tienen como función eliminar patógenos y cuerpos extraños del huésped. Dentro de los mecanismos que posee el macrófago al fagocitar la bacteria se encuentra el someter a la célula a especies reactivas de nitrógeno, como lo es el óxido nítrico (NO); esto priva a la bacteria de un suministro adecuado de oxígeno (o hipoxia); seguidamente, el fagosoma (creado al fagocitar la bacteria) se une al lisosoma lo que degrada y finalmente elimina el patógeno (Warner y Mizrahi 2007; Beste et al. 2009; Voskuil et al. 2011; Schnappinger et al. 2003).

En contraste, la exposición a condiciones de hipoxia o a niveles no tóxicos de NO en *Mycobacterium tuberculosis*, induce la expresión de un conjunto de genes llamados “regulón de dormancia”; de igual forma, la bacteria segrega diversas sustancias que bloquean la unión del fagosoma al lisosoma evitando la posible eliminación de la bacteria, convirtiendo a los macrófagos en su hábitat primario. La activación de estos genes genera cambios en el metabolismo de *M. tuberculosis* entre los cuales se incluye la sustitución de azúcares por ácidos grasos como fuente de carbono y la activación del metabolismo anaerobio, aunque aún no se conoce como la bacteria regula el flujo de

electrones durante la infección (Muñoz-Elías & McKinney 2005; Muñoz-Elías et al. 2006; Rhee et al. 2011; Shi et al. 2005; Voskuil et al. 2011; Warner & Mizrahi 2007).

▪ Rutas asociadas a las fuentes de carbono

A diferencia de otras bacterias que al ser expuestas a diferentes fuentes de carbono presentan un comportamiento diaúxico, *Mycobacterium tuberculosis* no utiliza la represión catabólica como mecanismo regulatorio, lo cual le permite, de forma simultánea, co-catabolizar diferentes fuentes de carbono. Lo anterior es posible debido a que cada fuente de carbono se metaboliza en diferentes partes de las rutas bioquímicas (segregación metabólica) y a las variaciones generadas en el ciclo de ácidos tricarbóxicos (Baughn et al. 2009; de Carvalho et al. 2010).

El estudio realizado por Baughn (2009) muestra que las variaciones (**Figura 1-4**) exhibidas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos están fuertemente ligadas a la fuente de carbono; cuando la fuente de carbono son lípidos o productos derivados de la β -oxidación, las rutas metabólicas que intervienen en el crecimiento son el ciclo del metil-citrato, el *shunt* (o derivación) de glioxilato, la ruta canónica de los ácidos tricarbóxicos, la cual se completa por la acción de la ferredoxin oxidoreductasa, (esta enzima suple la ausencia de α -cetodeshidrogenasa y es dependiente de la β -oxidación), y la ruta de gluconeogénesis. Dado que la ferredoxin oxidoreductasa es dependiente de la β -oxidación Baughn (2009) propone que, cuando la fuente de carbono son carbohidratos, se presenta una nueva variación en el ciclo de ácidos tricarbóxicos, lo cual incluye como intermediario el semialdehído succínico.

Beste (2011) demuestra, mediante la utilización de marcaje isotópico de carbono 13, la utilización de nuevas rutas al tener como fuente de carbono glicerol; dentro de estas rutas se encuentra el *shunt* de glioxilato, que en conjunto con las rutas de oxidación de piruvato, permiten el crecimiento de *M. tuberculosis*.

1.3 Aproximación sistémica

El uso de modelos para entender o predecir el comportamiento de una enfermedad infecciosa no es nuevo. Sin embargo, estos modelos, de corte epidemiológico o cinético, no permiten analizar en profundidad el metabolismo del microorganismo patógeno

durante sus estadios infecciosos, en condiciones adversas y/o bajo la influencia de fármacos. Así, durante la última década ha tomado gran interés el modelado metabólico de enfermedades infecciosas (Beste et al. 2007; Jamshidi & Palsson 2007; Puchałka et al. 2008; Oberhardt et al. 2008; Oberhardt et al. 2010). El modelado metabólico permite estudiar el microorganismo como un sistema completo, en el que cada uno de los componentes del sistema interaccionan entre sí, respondiendo en conjunto a cambios o perturbaciones externas; factores como la virulencia, la capacidad de un organismo en crecer dentro de un hospedero, y la resistencia a fármacos, entre otros, se encuentran ligados a los cambios que sufre el metabolismo en respuesta a las perturbaciones.

Existen dos aproximaciones al modelado y la simulación del metabolismo en los microorganismos: la aproximación dinámica y la estática (Yugi et al. 2005). El modelo dinámico se construye a partir de ecuaciones cinéticas y requiere de parámetros cinéticos y velocidades de reacción permitiendo obtener un entendimiento del comportamiento espacio-temporal de una red metabólica (Park et al. 2009); en *M. tuberculosis*, se ha utilizado para obtener blancos potenciales de drogas anti-tuberculosis en el ciclo de ácidos tricarboxílicos (Singh & Ghosh 2006). El modelo estático que se genera teniendo como base la estequiometría de las reacciones en la red bioquímica, ha sido empleado para el análisis del metabolismo de *M. tuberculosis* representando estados específicos de la bacteria (Beste et al. 2007; Jamshidi & Palsson 2007; Beste et al. 2011) e interacciones con el macrófago (Bordbar et al. 2010; Beste et al. 2013). Debido a la dependencia de información detallada sobre las enzimas presentes en una red metabólica, los modelos cinéticos se limitan al análisis de pequeñas redes dificultando una visualización sistémica del metabolismo; por otra parte, los modelos estequiométricos permiten el análisis a gran escala del metabolismo permitiendo un mejor entendimiento del estado y capacidades metabólicas de la célula.

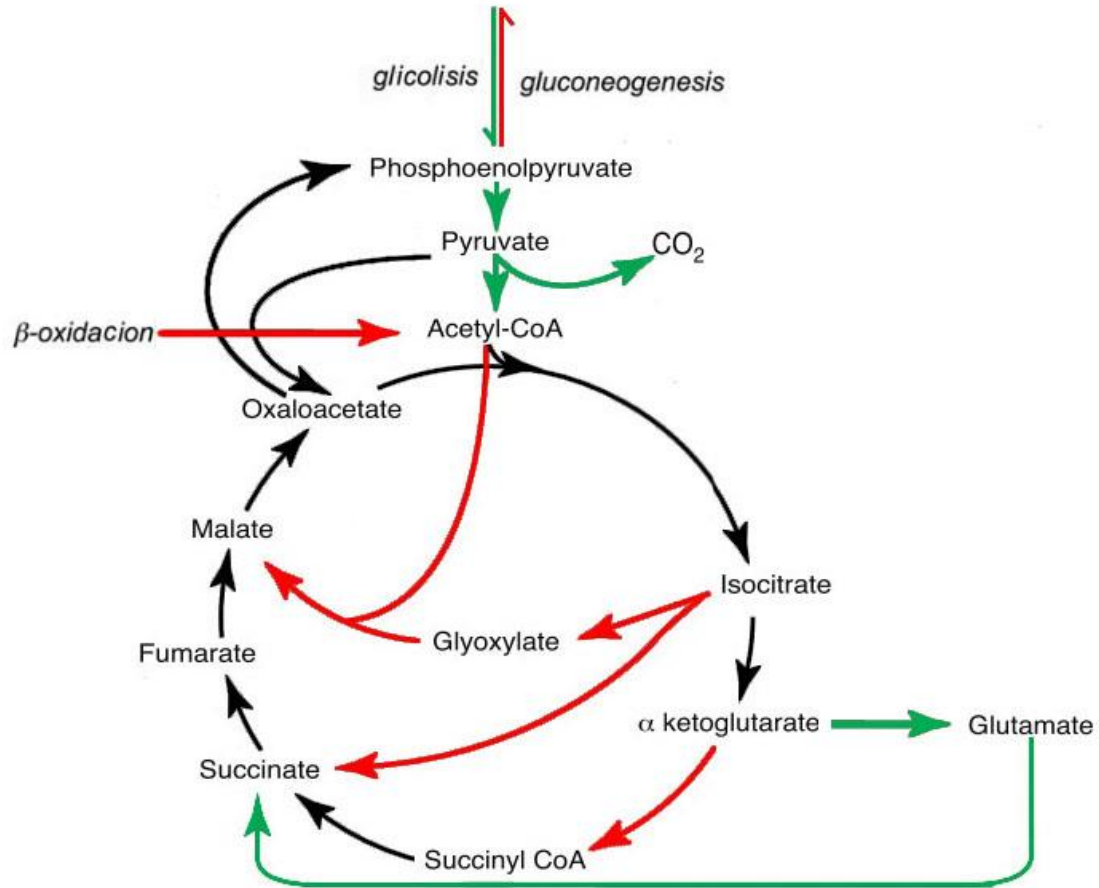


Figura1-4: — Variaciones en el ciclo de ácidos tricarboxílicos en *M. tuberculosis*. — Indica las rutas utilizadas durante el crecimiento en ácidos grasos como única fuente de carbono; — indica las rutas utilizadas en conjunto con la β-oxidación y comunes a las dos fases de crecimiento.

Los modelos estequiométricos son la base del análisis de flujos metabólicos (*Metabolic Flux Analysis*, MFA), el MFA es una técnica analítica que permite cuantificar los flujos metabólicos intracelulares en una red permitiendo obtener información de aspectos funcionales de una red bioquímica (Stephanopoulos et al. 1998).

En *Mycobacterium tuberculosis* se han utilizado principalmente dos métodos: el análisis de flujos basado en ¹³C (¹³C-*Metabolic Flux Analysis*, ¹³C-MFA) (Beste et al. 2011; Beste et al. 2013) y el análisis de balance de flujos (*Flux Balance Analysis*, FBA) (Raman et al. 2005; Beste et al. 2007; Jamshidi & Palsson 2007). El ¹³C-MFA utiliza fuentes de carbono marcadas isotópicamente y analiza los patrones de enriquecimiento del ¹³C en los

metabolitos mediante resonancia magnética nuclear o cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas; los datos obtenidos sirven restricciones de tipo experimental y permiten estimar los flujos metabólicos *in vivo* al interior de la bacteria (Zamboni et al. 2009).

1.3.1 Análisis de balance de flujos (FBA)

En el FBA el modelo estequiométrico puede ser representado por la siguiente ecuación:

$$S \cdot v = \frac{dx}{dt} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde S es la matriz $m \times n$ de los coeficientes estequiométricos (siendo m es el número de metabolitos y n es el número de reacciones en la red), v es el vector que representa todos los flujos metabólicos (incluyendo flujo interno, flujo de transporte y flujo de crecimiento), y dx/dt es el cambio en las concentraciones de los m metabolitos. La magnitud de los flujos puede ser restringida atendiendo a las limitaciones de la capacidad metabólica de la célula: $\alpha \leq v \leq \beta$ (donde α y β son los límites inferior y superior de los flujos). Estas limitaciones o restricciones pueden ser de carácter fisicoquímico, topológico o medio ambiental; otras variables como la termodinámica de las reacciones y la expresión génica también se pueden tomar como parte de estas restricciones (Beste et al., 2007; Raman et al., 2005; Jamshidi and Palsson, 2007; Gombert and Nielsen, 2000; Colijn et al., 2009).

Al asumir un estado estacionario se supone que no existe acumulación de los metabolitos y la concentración de estos no cambia eliminando la variación con respecto al tiempo en la ecuación (1), obteniéndose como resultando,

$$S \cdot v = 0 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Esta ecuación de balance representa la principal restricción al problema de optimización que se genera en el FBA. Normalmente estos modelos conforman un sistema sub-determinado, en donde el número de reacciones (flujos) es mayor al número de metabolitos intracelulares lo que permite un número infinito de soluciones (combinaciones de flujos).

La versatilidad del FBA ha permitido la reducción de las soluciones en los flujos metabólicos al aplicar restricciones adicionales logrando que los resultados de las simulaciones se ajusten al comportamiento real de la célula. En la Tabla 1-1 se presenta un resumen de las estrategias computacionales y las restricciones que han sido utilizadas en la simulación del metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los métodos *In silico* se basan principalmente en técnicas de optimización con diversas restricciones que mejoran el desempeño de la simulación; la solución de sistemas sub-determinados utiliza métodos computacionales de programación lineal.

Programación lineal (*Linear programming*, LP)

Esta técnica consiste en optimizar (minimizar o maximizar) una función lineal, denominada función objetivo, de tal forma que las variables de dicha función estén sujetas a una serie de restricciones que se expresan mediante un sistema de ecuaciones lineales. Las funciones son expresiones matemáticas que representan el propósito del problema de optimización como maximizar la velocidad de crecimiento o maximizar/minimizar la formación de un producto. El problema de optimización para LP se puede representar como:

$$\text{Maximizar/minimizar } Z = \mathbf{c} \cdot \mathbf{v} \quad \text{s. t.} \quad \alpha \leq v \leq \beta. \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde, \mathbf{c} es un vector que muestra la influencia de los flujos individuales en la función objetivo, definido por los coeficientes para cada flujo en \mathbf{v} , la forma de la función objetivo y el método de solución del problema de optimización varían dependiendo del propósito deseado (Park et al. 2009). Para FBA, E-flux, FVA la distribución de flujos se calcula por medio de programación lineal (*Linear Programming*, LP), en cambio para SR-FBA y PROM se utiliza programación lineal entera mixta (*Mixed Integer Linear Programming*, MILP). En la Tabla 1-1 se presenta un resumen de los métodos anteriormente mencionados y sus respectivas restricciones.

E-flux es un método que permite predecir la capacidad metabólica incorporando datos de expresión génica dentro de las restricciones del modelo; FVA es usado para evaluar el grado de flexibilidad de una red metabólica hallando los límites máximo y mínimo de todos los fluxes en estado estacionario, *Steady-State Regulatory Flux Balance Analysis*

(SR-FBA) predice, a gran escala, la expresión génica y los flujos metabólicos generando un modelo metabólico-regulatorio; *Probabilistic Regulation of Metabolism* (PROM) permite la integración directa, automatizada y cuantitativa de gran cantidad de datos en el modelado basado en restricciones, lo que lo convierte en una herramienta ideal para construir modelos de red reguladores-metabólicos a escala genómica para organismos menos estudiados.

Tabla 1-1: Sumario de varios algoritmos utilizados en la simulación del metabolismo de *M. tuberculosis*. Abreviación: FBA, flux balance analysis; FVA, flux variability analysis; SR-FBA, steady-state regulatory flux balance analysis; PROM, probabilistic regulation of metabolism.

Algoritmo	Restricciones	Objetivo	Referencia
FBA	Velocidad consumo de sustrato, velocidad excreción de metabolitos.	Predecir la distribución de flujos intracelulares maximizando una función objetivo (Biomasa, producción metabolito)	Raman et al. (2005); Beste et al. (2007); Jamshidi & Palsson (2007); Bordbar et al. (2010)
E-Flux	Mediciones en la expresión de genes	Predecir directamente los cambios en la capacidad de flujos metabólicos	Colijn et al. (2009)
FVA	Velocidad consumo de sustrato, velocidad excreción de metabolitos	Permite examinar los flujos máximos y mínimos de cada reacción en comparación con los cambios en el espacio de la solución de flujo después de amplificar una reacción en específico.	Beste et al. (2007); Beste et al. (2011); Beste et al. (2013); Jamshidi y Palsson (2007)
SR-FBA y PROM	Restricciones para regulación, mapeo de genes hasta reacción, estado de la enzima de reacción.	Predice la expresión de genes y flujos metabólicos, integra metabolismo y regulación. PROM vence los inconvenientes de SR-FBA permitiendo una integración directa entre modelos transcripcionales y metabólicos.	Chandrasekaran y Price (2010)

CPLEX (IBM ILOG CPLEX optimization studio)

Es un programa de decisión analítica para un rápido desarrollo y despliegue de modelos de optimización, llamado por el método simplex implementado en el lenguaje de programación C. Permite la solución de problemas de *programación entera*, extensos problemas de *programación lineal* con un alto número de variables y problemas de *programación cuadrática*.

1.4 Herramientas para el estudio del metabolismo celular

La Tabla 1-2 presenta un listado de programas y herramientas de interés en biología de sistemas (Tabla 1-2).

Java Web Simulation (JWS) es una aplicación que provee una colección de modelos de sistemas biológicos curados. Los modelos generados por usuarios pueden ser cargados y guardados en la base de datos de JWS; de igual forma JWS permite realizar simulaciones y análisis de estos modelos desde el explorador de internet. *Pathway tools* es un programa desarrollado para la creación, anotación, comparación y análisis de modelos metabólicos, entre otras cosas; provee herramientas avanzadas de búsqueda que facilitan el hallar metabolitos sin salida y potenciales blancos de drogas en modelos metabólicos.

13CFLUX es un programa útil en el análisis de flujos metabólicos usando sustratos isotópicamente marcados. Depende de la especificación de una red metabólica con las transiciones atómicas correspondientes, y la medición de las velocidades de consumo y secreción de metabolitos. El método permite la determinación de patrones de marcaje isotópico y a su vez la cuantificación detallada de las velocidades de reacción, *in vivo*, bajo condiciones de estado metabólico estacionario. *13CFLUX2* es una actualización del programa en la cual se añaden características como: personalizar el modelado de la red, simular los estados de marcación isotópica, estimación de parámetros, la realización de análisis estadísticos y diseños experimentales.

Además de los programas anteriormente mencionados, se han publicado nuevos proyectos que proporcionan características únicas para el intercambio y almacenamiento

de modelos metabólicos. *FAME* es un programa en línea que posibilita la visualización de los modelos metabólicos al generar mapas interactivos; permite al usuario cargar modelos propios o construir nuevos modelos basados en la enciclopedia Kyoto Enciclopedia de genes y genomas (KEGG por sus siglas en inglés). *CADLIVE* (*Computer-Aided Design of Living Systems*) es una aplicación diseñada para la construcción y análisis de redes biológicas a gran escala; convierte automáticamente mapas de redes bioquímicas en modelos matemáticos permitiendo simular modelos dinámicos y el análisis de propiedades topológicas. *OMIX* es una herramienta de diseño de diagramas de redes bioquímicas que ofrece una representación programable de los componentes de la red, permitiendo mostrar información topológica y cuantitativa relacionada con las redes bioquímicas; las redes creadas en este programa pueden ser exportadas en diferentes formatos para ser simuladas. *FIAT* es una herramienta desarrollada para describir cuantitativamente el metabolismo intracelular; está dirigida principalmente a usuarios que no están familiarizados con métodos numéricos o experimentos de rastreo isotópico.

Tabla 1-2: Herramientas computacionales para el modelado del metabolismo celular.

Nombre	Editor de modelos	Simulación	Análisis	Referencia
13CFLUX(2)				(Weitzel et al. 2013)
CADLIVE				Kurata et al. (2007)
Biocham				http://contraintes.inria.fr/biocham/
BioCyc				Karp et al. (2005)
BioUML				http://www.biouml.org/
CellDesigner				Funahashi et al. (2008)
CellNetAnalyzer				Klamt et al. (2007)
Cellware				Dhar et al. (2004)
COBRA Toolbox 2.0				Schellenberger et al. (2011)
COPASI				Hoops et al. (2006)
Cytoscape				http://www.cytoscape.org/
FIAT				(Zamboni et al. 2005)
FAME				Boele et al. (2012)
GNU MCSim				http://www.cytoscape.org/
JigCell				Vass et al. (2006)
JWS				Snoep & Olivier (2002)
Omix				Droste et al. (2013)
Pathway tool				Karp et al. (2010)

Tabla 1-2: (Continuación)

Nombre	Editor de modelos	Simulación	Análisis	Referencia
PaVESy				Lüdemann et al. (2004)
PhysioDesigner				Asai et al. (2011); Ghosh et al. (2011)
PNK 2e				http://page.mi.fu-berlin.de/trieglaf/PNK2e/index.html
PyDtool				Clewley (2012)
XPPAut				Ghosh et al. (2011)
VANTED				Junker et al. (2006)

1.4.1 Software disponible para el análisis de flujos metabólicos en *M. tuberculosis*.

En la Tabla 1-2 se presentan algunas aplicaciones utilizadas para la simulación y análisis de modelos metabólicos; entre estas solo *CellNetAnalyzer*, COPASI, COBRA y 13CFUX han sido utilizados para el estudio del metabolismo de *M. tuberculosis* debido a su complejidad.

Entre los programas que permiten obtener una aproximación al análisis de flujos metabólico se encuentra el toolbox de MATLAB® *Constraints Based Reconstruction and Analysis* (COBRA) (<http://opencobra.sourceforge.net/openCOBRA/Welcome.html>) para MATLAB. COBRA utiliza restricciones fisicoquímicas para definir un conjunto de estados fenotípicos factibles para una red metabólica en determinada condición (Schellenberger et al., 2011); estas restricciones incluyen: compartimentalización, conservación de masa, aglomeración molecular y direccionalidad de las reacciones determinadas atendiendo a su condición termodinámica.

CellDesigner es una herramienta de modelamiento de redes bioquímicas. Soporta los formatos SBML (*System Biology Markup Language*) y SBW (*System Biology Workbench*); esta herramienta fue usada dentro del proyecto de descubrimiento de fármacos de código abierto (OSDD, *Open Source Drug Discovery*) para *M. tuberculosis*, con el fin de crear un mapa de interacciones moleculares a gran escala (Chandra et al. 2011).

En este trabajo se hace uso del programa *CellNetAnalyzer* (CNA) (<http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/projects/cna/cna.html>). CNA es una interfaz gráfica diseñada para trabajar bajo el programa MATLAB® (Mathworks Inc.); facilita un análisis estructural y funcional de diferentes tipos de redes celulares. CNA presenta una nueva estructura de modelado que permite examinar redes de flujo de transmisión de señales ampliando la funcionalidad de su predecesor *FluxAnalyzer*, desarrollado originalmente para el análisis de redes metabólicas (Klamt et al. 2003).

Básicamente CNA se encuentra constituido por dos partes: 1) proyectos de red (definido por el usuario), y 2) un *toolbox* con varias funciones para el análisis estructural de redes. Los proyectos de red son creados y diseñados por el usuario, pueden representar un flujo de masa (*Mass-flow*) para el modelamiento de flujo material como en redes metabólicas u otras redes de reacciones estequiométricas; también se puede representar el flujo de señales (*Signal-flow*) para el modelamiento de redes de traducción de señales o redes de regulación. Ambos tipos de redes abarcan una representación abstracta (simbólica) de la red; esta representación se encuentra formada por las reacciones y los compuestos (metabolitos) del modelo, y una representación gráfica que debe ser creada por un programa de edición de imágenes y luego importada a CNA. El *toolbox* de CNA, dependiendo del tipo de red (*mass-flow* o *signal-flow*), provee funciones y procedimientos que facilitan el análisis de la red. A continuación, se muestra un resumen de las funciones que *CellNetAnalyzer* posee según el tipo de proyecto de red.

RED DE TIPO *Mass-flow*

Análisis de Flujos Metabólicos

- Clasificación de escenarios (determinación y redundancia).
- Calculo de distribuciones de flujo.
- Análisis de Balance de Flujos (FBA).
- Análisis de sensibilidad.
- Factibilidad de un determinado escenario.

Análisis de propiedades topológicas y estructurales

- Presentación gráfica de la matriz estequiométrica.
- Detección de relaciones elementales, Subconjunto de enzimas, isoenzimas, reacciones bloqueadas y paralelas.

Análisis de mapas metabólicos

- Cálculo de nodos (modos) elementales.
- Presentación de rutas computadas en mapas interactivos.
- Análisis estadístico de las rutas:
 - Detección de rutas óptimas.
 - Participación de reacciones y predicción de fenotipos mutantes.

Conjunto de cortes mínimos

- Encuentra blancos y analiza la fragilidad de las reacciones bioquímicas en la red.
- Cálculo de cortes mínimos (respecto a un conjunto de blancos, modos elementales).
- Análisis estadísticos y valoración del conjunto de cortes mínimos.

RED DE TIPO *Signal-flow*

Análisis de interacción de gráficos

- Propiedades topológicas básicas.
- Análisis estadísticos de todas las rutas de señalización (positivas y negativas) que conectan entradas y salidas en conjuntos de nodos de inicio y final.
- Cómputo y análisis de bucles de retroalimentación (*feedback loops*).
- Cómputo de conjunto de cortes mínimos para determinada ruta o bucle (recorte de reacciones o especies).
- Análisis de dependencia: Influencia de especies, identificación de activadores e inhibidores en determinada especie (predicción de ensayos de perturbación).
- Detección de inconsistencias entre datos experimentales y la dependencia de la matriz.

Análisis lógico de interacción de las redes (Boolean)

- Modelos lógicos arbitrarios con múltiples niveles discretos.
- Análisis lógico en estado estacionario para un conjunto de estados: Estudio del comportamiento entrada-salida y procesamiento de señales.
- Computo de intervenciones mínimas que provocan un determinado comportamiento en la red.
- Conversión automática de modelos lógicos a un gráfico de interacción.

CellNetAnalyzer también provee de funcionalidades API (*Application Programming Interface*), estas funcionalidades permiten a los desarrolladores: Leer, escribir, importar o exportar la estructura de red de un proyecto; permite al desarrollador construir e integrar complementos nuevos para CNA, y cambiar atributos de los proyectos directamente de la línea de comandos de MATLAB®.

1.4.2 Bases de datos disponibles para el estudio de *M. tuberculosis*

Dentro de las bases de datos de uso general ampliamente usadas para el estudio del metabolismo celular se encuentra KEGG (*The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). KEGG es el punto de partida para el modelamiento metabólico, permite un alto nivel de entendimiento de las funciones y utilidades de un sistema biológico a partir de información genómica y molecular; además, se encuentra integrada por siete bases de datos interrelacionadas en las cuales se categorizan en información de los sistemas, información genética e información química (Kanehisa et al. 2006). BRENDA (*BRaunschweig ENzyme DAtabase*) es el principal sistema de recolección de datos sobre las propiedades y funcionalidad de enzimas; los contenidos en la base de datos cubren información de la función, estructura, preparación y aplicación de las enzimas (Scheer et al. 2011). *ByoCyc* es una colección de bases de datos que describen el genoma y las rutas metabólicas de un organismo, proporciona un análisis comparativo de métodos para redes metabólicas (Karp et al. 2005).

Específicamente son tres las bases de datos claves para el estudio y modelado del metabolismo de *M. tuberculosis*: *Tuberculist* (Lew et al. 2011), *TB database* (Reddy et al. 2009) y *PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center)* (Gillespie et al. 2011). *TB database* es una base de datos integrada, provee acceso a datos genómicos de *M.*

tuberculosis y a recursos relevantes para el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas contra la Tuberculosis. *Tuberculist* es una base de datos que presenta información derivada del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, la cepa de referencia comúnmente usada para el estudio de la tuberculosis; esta base de datos está sujeta a continuas actualizaciones. PATRIC es un sistema de información diseñado como soporte para las investigaciones biomédicas, básicas y aplicadas, realizadas en enfermedades infecciosas bacterianas; integra datos a escala genómica, metadatos y herramientas para el análisis de todas las bacterias patógenas. Un análisis más detallado sobre estas bases de datos especializadas en *Mycobacterium tuberculosis* puede ser hallado en el trabajo realizado por Lew (2013).

2. Aproximación sistémica al metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*.

El análisis de flujos metabólicos (*Metabolic Flux Analysis*, MFA) ha sido ampliamente usado en la cuantificación de flujos intracelulares en el metabolismo central y anabólico, y en el análisis de las capacidades metabólicas de organismos celulares; en bacterias por ejemplo, se ha usado para evaluar la red metabólica de *Escherichia coli* en la producción de hidrógeno, a partir de glucosa (Manish et al. 2007); en levaduras, el uso de MFA permitió confirmar hipótesis sobre el metabolismo de la xilosa en *Saccharomyces cerevisiae* (Pitkänen et al. 2003); en plantas, el MFA demostró diferencias en la toma de nutrientes en dos fenotipos distintos de *Arabidopsis thaliana* (Lonien & Schwender 2009); en células animales, la utilización del método ha permitido aumentar el conocimiento sobre los efectos de diferentes drogas en cultivos celulares de células hepáticas humanas (Niklas et al. 2009) y el estudio del metabolismo celular del cultivo de ovario de hámster (CHO-320), al permitir representar funciones intracelulares y puntos de interacción gen-proteína y metabolismo (Zamorano et al. 2010).

El MFA fue utilizado por primera vez en *Mycobacterium tuberculosis* por Raman (2005), como técnica de estudio de las redes bioquímicas que llevan a la síntesis de ácido micólico; adicionalmente, el estudio tuvo como propósito identificar blancos metabólicos en las redes para el diseño racional de fármacos contra la tuberculosis. El modelo propuesto incluyó 197 metabolitos y 219 reacciones catalizadas por 28 enzimas. A partir del modelo, el análisis de distribución de flujos metabólicos y la delección sistemática de genes permitieron encontrar que, además de la enzima InhA (inhibida por el fármaco Isoniazida), las enzimas AccD3, FAS, FabH, Pks13, DesA1/2 y DesA3 son blancos potenciales para el diseño de fármacos contra la tuberculosis; Raman (2005) demostró que es posible identificar de manera racional, blancos metabólicos, susceptibles de ser tratados a partir de técnicas de ingeniería genética, mediante la aplicación de FBA.

Los modelos propuestos por Beste (2007) y Jamshidi y Palsson (2007), se han construido a partir del genoma de *M. tuberculosis*. El trabajo de Beste (2007) es la primera reconstrucción a escala genómica del metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*; el modelo obtenido a partir de esta reconstrucción consta de 849 reacciones y 739 metabolitos involucrando 726 genes. Mediante el uso de FBA se calcularon las velocidades de consumo de diferentes sustratos y se pronosticaron genes esenciales en el crecimiento de la bacteria. Además de predecir qué objetivos farmacológicos ya conocidos son esenciales, el modelo demostró el papel potencial de la enzima isocitrato liasa (ICL) durante la fase de crecimiento lento de la micobacteria, lo cual fue verificado experimentalmente.

Jamshidi y Palsson (2007) utilizaron el MFA en la cepa *In silico* (iNJ661) de *M. tuberculosis* H37Rv con el fin de analizar la capacidad de la red metabólica durante el crecimiento en diferentes medios de cultivo. El modelo de la cepa *In silico* consta de 661 genes y 939 reacciones, las cuales permiten sintetizar gran parte de los metabolitos de gran complejidad, característicos de *M. tuberculosis*. En la simulación y análisis del modelo fue utilizado el programa COBRA Toolbox 2.0 (*constrain-based reconstruction and analysis*). Como resultado de este trabajo, los autores propusieron una nueva alternativa al tratamiento de la tuberculosis, pero con objetivos farmacológicos equivalentes a los de las drogas Isoniacida y Rifapicina (inhibe la ARN polimerasa bacteriana).

Los modelos anteriormente mencionados han servido como base a nuevas aproximaciones para el estudio del metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*; así, Colijn (2009) retomó los modelos propuestos por Raman (2005) y Beste (2007), extendió la técnica de MFA al modelar las restricciones máximas de flujo como función de los niveles de expresión de genes (E-Flux) dando lugar a una mayor precisión. E-Flux permitió predecir de manera directa los cambios en la distribución de flujo metabólico. El modelo fue usado para predecir el impacto de 75 fármacos, de su combinación, y de la variación de las condiciones nutricionales sobre la capacidad del microorganismo para sintetizar ácido micólico. El método correctamente predijo siete de los ocho inhibidores

de síntesis de ácidos grasos, al igual que un número adicional de potenciales moduladores de la síntesis de ácidos micólicos.

De igual forma, el modelo de Jamshidi y Palsson (2007) sirvió de base para los modelos propuestos por Fang (2009) y por Bordbar (2010). Fang (2009) exploró el efecto *In silico* del 3-Nitropropionato, (inhibidor metabólico de los ciclos del glioxilato y metilcitrate) en un medio restringido a ácidos grasos y el sAMS, un inhibidor de la síntesis de micobactina, que es un sideróforo que captura hierro dentro de los macrófagos para la supervivencia del patógeno. Este modelo (iNJ661) fue combinado con un modelo de cinética de inhibición enzimática (Singh & Ghosh 2006) y uno de crecimiento poblacional, el modelo posibilitó la predicción de curvas dosis-respuesta de crecimiento cuando se somete a distintas dosis de estos inhibidores. Bordbar (2010), por su parte, construyó un modelo que incorporó interacciones patógeno-hospedero; inicialmente construyó una red metabólica de un macrófago alveolar y lo integró a la reconstrucción *In silico* propuesta por Jamshidi, iNJ661. Este modelo consistió de 3 compartimentos: el macrófago, fagosoma, y el patógeno dentro del fagosoma. Este fue el primer modelo de *M. tuberculosis* que mimetiza las interacciones patógeno-hospedero y que permitió modelar distintos estados patológicos usando el modelado metabólico.

Aunque el modelo metabólico de Jamshidi iNJ661 reprodujo velocidades de crecimiento en diferentes medios y predijo genes esenciales en condiciones *in vitro*, este carecía de poder predictivo de genes esenciales en condiciones *in vivo*. Fang (2010) propuso un procedimiento sistemático para modificar este modelo basado en diferencias de genes esenciales *in vivo* entre predicciones computacionales y datos experimentales. Después de estas modificaciones se desarrolló un modelo que generó mejores predicciones *in vivo* (iNJ661v), en el ambiente del hospedero. Con este modelo, se encontró que los genes que corresponden a citocromo bd oxidasa, y nitrato reductasa son esenciales, ya que estos grupos enzimáticos están asociados con respiración aerobia y anaerobia, además nitrato reductasa se encarga de reducir el NO_2^- en amonio usando H^+ , permitiéndole a *Mycobacterium tuberculosis* adaptarse a ambientes ácidos dentro de los macrófagos.

Beste (2011), estudio del metabolismo de *M. tuberculosis* usando la técnica ^{13}C -MFA, encontrando una nueva ruta para la oxidación del piruvato, basado en la ruta del glioxilato y reacciones anapleróticas; esta ruta fue nombrada *GAS pathway* (la ruta el

glioxilato, anaplerosis y succinil CoA) y permitió confirmar que la enzima ICL es esencial en la persistencia del patógeno. Otro descubrimiento importante fue la identificación de la fijación del CO₂ por medio de reacciones anapleróticas de la ruta GAS; se observó que el CO₂ puede ser un compuesto clave en la patogenicidad de *M. tuberculosis* debido a su abundancia en las células del hospedero.

Estudios de ¹³C permitieron confirmar y proponer nuevas hipótesis sobre el metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*. En el trabajo más reciente de Beste (2013), se empleó ¹³C-flux spectral analysis (FSA) para identificar las fuentes de carbono utilizadas por *M. tuberculosis* dentro del hospedero. Este estudio demostró que la bacteria es capaz de asimilar una mezcla de aminoácidos (Alanina, Glutamato/Glutamina), compuestos C₂ y C₃ como sustratos dentro de las células del hospedero, así como otros sustratos derivados del CO₂.

Otro aspecto que ha sido estudiado haciendo uso del modelado metabólico en *Mycobacterium tuberculosis* es su adaptación a bajas concentraciones de oxígeno o condiciones de hipoxia al interior de los macrófagos. La hipoxia es una de las características que están asociadas con la etapa de latencia en el hospedero, así como presencia de óxido nítrico y monóxido de carbono. Fang (2012) desarrollaron un nuevo modelo para estudiar *M. tuberculosis*, incorporando datos de transcripción génica a la cepa *In silico* iNJ661v con el fin de identificar cambios en el metabolismo relacionados con hipoxia. Este modelo predijo correctamente la baja asimilación de oxígeno, velocidad de producción de ATP y una mayor velocidad de crecimiento en condiciones de hipoxia, al compararla con la mutante $\Delta dosR$, lo que indica que la presencia del regulón *dosR* es esencial para que el patógeno se adapte a estas condiciones de hipoxia. El regulón *dosR* es un conjunto de al menos 48 genes co-regulados que permiten sobrevivir a la bacteria largos periodos de anaerobiosis (Voskuil et al. 2004; Bartek et al. 2009; Leistikow et al. 2010; Voskuil et al. 2011). Por otra parte, se observó que la variación en la composición de biomasa mostró un incremento en concentración de los metabolitos requeridos para el crecimiento de la pared celular.

De otra parte, Galagan (2013), construyeron una pequeña red de regulación para *M. tuberculosis* en condiciones de hipoxia. Esta red se encontraba constituida por 50

factores de transcripción; el estudio reveló una conexión directa entre la respuesta celular en condiciones de hipoxia, el catabolismo y anabolismo de lípidos y la producción de componentes de la pared celular. Estas respuestas se asociaron con el regulón (activador) DosR y el represor KstR, el primero media la respuesta a condiciones de hipoxia, y el segundo regula la degradación de colesterol, lípidos y el metabolismo energético (Galagan et al. 2013).

2.1 Metodología

2.1.1 Construcción del modelo metabólico - Abstracción

El desarrollo de una propuesta preliminar de las redes metabólicas asociadas a la síntesis de ácido micólico se inicia mediante una etapa de abstracción, comenzando por las rutas de obtención de energía, presentes en los diversos microorganismos; como trabajo base se adoptó el realizado por Cole (1998). *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) desarrolla su actividad metabólica a partir de las rutas de glicolisis/gluconeogénesis, la ruta de pentosa fosfato, y el ciclo de los ácidos tricarbónicos; la ruta de Entner-Doudoroff no permanece activa en *M. tuberculosis* (Muñoz-Elías & McKinney 2006).

Luego de una completa revisión de literatura sobre el metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*, se identificaron las rutas metabólicas necesarias para el crecimiento y viabilidad celular; entre otras se consideraron, el flux de carbono hacia glioxilato a partir del ciclo de ácidos tricarbónicos, el ciclo del metil-citrato, una bifurcación que comprende la intervención de la enzima succínico semialdehído deshidrogenasa, y la ruta GAS que utiliza la derivación de glioxilato y la ruta anaplerótica para la oxidación de piruvato (McKinney et al. 2000; Muñoz-Elías et al. 2006; Shi et al. 2010; Beste et al. 2011; Baughn et al. 2009). La ruta metabólica para la síntesis de ácidos micólicos (α -micolato, metoxi-micolato y ceto-micolato) se definió con base en el trabajo realizado por Raman (2005), y por Jamshidi y Palsson (2007). Las rutas bioquímicas para la β -oxidación de ácidos grasos pares e impares fueron incluidas al modelo, dada su importancia durante el proceso infeccioso (Muñoz-Elías & McKinney 2006).

Las bases de datos KEGG (Kanehisa et al. 2006) y BRENDA (Scheer et al. 2011) fueron usadas para obtener información sobre las proteínas comprometidas en las rutas seleccionadas para *Mycobacterium tuberculosis*; luego de este primer acercamiento a la construcción de una red metabólica para *M. tuberculosis*, se realiza un análisis comparativo, ruta a ruta, con la literatura y las bases de datos especializadas: TB Database (Reddy et al. 2009), Tuberculist (Lew et al. 2011) y la base de datos BioCyc (Karp et al. 2005), en busca de reacciones no presentes en los mapas propuestos, de manera que sea posible llenar los vacíos en las redes bioquímicas consideradas, necesarias para el crecimiento y la síntesis de ácidos micólicos. Esta etapa es crítica si se tiene en cuenta que el modelo a construir contemplará alrededor de 100 reacciones, y que estas deben ser representativas de la actividad metabólica de la bacteria.

Con el fin de verificar que todas las proteínas esenciales para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* hayan sido consideradas en el mapa metabólico propuesto y eventualmente adicionar algunas que hayan sido omitidas, se analizan los trabajos desarrollados por Sasseti (2003) y Beste (2009). Sasseti identifica los genes (por ende las proteínas ligadas a estos genes) necesarios para el crecimiento de *M. tuberculosis* en un medio mínimo de glucosa, (Sasseti et al. 2003; Sasseti & Rubin 2003); Beste, por otra parte, halla los genes requeridos para el crecimiento de la micobacteria en un medio mínimo de glicerol.

Finalmente se obtiene un mapa metabólico para *Mycobacterium tuberculosis* que contiene 100 reacciones y 82 metabolitos. En el Anexo A se presenta el sistema de reacciones seleccionado; el mapa metabólico completo se presenta en la Figura 2-1.

2.1.2 Construcción del modelo metabólico – Formulación.

La matriz estequiométrica, S , se construyó con base en las reacciones descritas en la etapa de abstracción. La ecuación de biomasa fue definida según los componentes de biomasa de *M. tuberculosis* publicados en los trabajos de Beste (2007) y Raman (2005). Esta ecuación contempla una composición macromolecular mínima en la cual se incluyen solo los componentes esenciales para el crecimiento de *M. tuberculosis* (ADN, ARN, proteínas), teniendo como premisa que los únicos componentes de membrana son los ácidos micólicos. Se hizo uso del análisis de balance de flujos (FBA) para la distribución

de flujos metabólicos, asumiendo estado estacionario para las concentraciones de los metabolitos intracelulares.

Como el número de flujos metabólicos o reacciones excede el número de metabolitos (restricciones de balance de masa), situación que describe un sistema sub-determinado, es necesario formular un problema de optimización que permita identificar un conjunto viable de distribución de flujos metabólicos que atienda al conjunto de restricciones impuestas. Para este propósito se utilizó programación lineal (*linear programming*, LP) previa definición de una función objetivo a maximizar (velocidad específica de crecimiento de biomasa y/o síntesis de ácidos micólicos) (Ecuación 3). El conjunto de restricciones principalmente consideró las asociadas a la estequiometría del sistema reaccionante seleccionado, y a los niveles altos y bajos de los diferentes fluxes o velocidades de reacción, definidos con base en la literatura (Raman et al. 2005; Beste et al. 2007; Jamshidi & Palsson 2007).

Con la abstracción del modelo y la función objetivo definidas se realizó la validación y posterior simulación y análisis de la distribución de flujos metabólicos, haciendo uso del programa *CellNetAnalyzer*.

2.1.3 Validación

La alta virulencia del sistema celular bajo estudio demanda una infraestructura especializada para el desarrollo de cultivos y la generación de datos experimentales, necesarios en estudios de validación. Esta propuesta no contempló la generación de datos experimentales por lo que, para propósitos de validación del modelo desarrollado, se utilizaron datos reportados en la literatura de reportes de literatura.

El primer reporte de literatura empleado para propósitos de validación fue el de Beste (2011). Como se ha mencionado previamente, en este trabajo los autores estudian del metabolismo de *M. tuberculosis* usando la técnica ^{13}C -MFA, confirmando que la enzima ICL es esencial en la persistencia del patógeno e identificando la fijación del CO_2 en la bacteria por medio de reacciones anapleróticas de la ruta GAS.

Los estudios de simulación a partir del modelo consideraron la formación de biomasa y la síntesis de ácidos micólicos (α -micolato, metoxi-micolato y ceto-micolato) como función

objetivo. Para el reporte de distribución de fluxes, los valores fueron normalizados, atendiendo a la velocidad de consumo específica de glicerol a la cual se le asignó un valor arbitrario de $100 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Adicionalmente, la validación consideró la reproducción de la distribución de fluxes como resultados del efecto de la inhibición de dos enzimas que son blancos farmacológicos en el metabolismo de *M. tuberculosis*: InhA (en FASII) inhibida por Isoniazida y Etionamida, y FASI inhibida por Pirazinamida. Las predicciones del modelo propuesto se compararon con los trabajos realizados por Raman (2005), Beste (2007) y Jamshidi (2007).

2.1.4 Ensayos de Simulación

- Estados metabólicos extremos

Se simularon dos eventos metabólicos extremos en el mapa metabólico simplificado de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 2-1). Un primer evento, en el cual se considera que la formación de biomasa constituye el factor primordial de la actividad metabólica durante el crecimiento de la micobacteria; y un segundo evento, en el que la síntesis de ácidos micólicos es el único factor de trascendencia durante el crecimiento de *M. tuberculosis*. Ambos casos se estudiaron bajo tres diferentes fuentes de carbono glucosa, glicerol y ácidos grasos

En todos los casos los valores de flujo se normalizaron a la respectiva velocidad de consumo de sustrato ($\text{mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$).

- Eventos metabólicos

Se simularon diferentes eventos metabólicos que eventualmente se presentan durante la actividad celular de *M. tuberculosis*. Estos son:

A) Glicerol y glucosa como fuentes de carbono

B) Glicerol y cadenas de ácidos grasos como fuente de carbono.

En ambos casos se tomó como función objetivo la formación de biomasa y la formación de ácidos micólicos; los valores de velocidad de consumo de sustrato no se restringieron y se permitió al modelo tomar los valores más adecuados para la solución del problema de optimización. El análisis de los valores determinó la base para encontrar los límites superiores en las velocidades de consumo de sustrato en las cuales el modelo no presenta errores y/o inconsistencias.

▪ Robustez del modelo

La robustez puede tener diferentes significados según sea el contexto; un modelo robusto es aquel que bajo pequeñas perturbaciones en sus parámetros mantiene el mismo comportamiento (Morohashi et al. 2002). La evaluación de robustez se realizó al variar un flujo en particular en un rango predefinido y observar los cambios en la función objetivo. Se simuló variaciones (perturbaciones) sobre los flujos de consumo de glucosa y glicerol, principalmente.

▪ Modos Elementales (MEs)

Un modo es elemental si no puede ser descompuesto en dos distribuciones de flujo más simples; puede ser interpretado como el mínimo de rutas en una red metabólica que, atendiendo a restricciones de tipo estequiométrico y termodinámico, permite una operación funcional de la red en estado estacionario (Schuster & Hilgetag 1994; Schuster 1999). Cada distribución posible de fluxes en estado estacionario en una red metabólica puede describirse como una combinación de MEs, así una distribución de flujos óptima no es más que una combinación lineal de MEs óptimos (Hädicke & Klamt 2010).

El uso de MEs se ha tornado en una herramienta importante para la ingeniería metabólica y la biotecnología; dentro de las aplicaciones para los MEs se encuentra la identificación de rutas metabólicas (Schuster 1999; Schuster et al. 2001; Papin et al. 2003) y la flexibilidad de la red (Stelling et al. 2002; Price et al. 2002; Papin et al. 2002); entre otras.

Los MEs fueron calculados para la red propuesta, haciendo uso del software *CellNetAnalyzer*. En el análisis se consideraron cuatro situaciones metabólicas definidas por la fuente de carbono alimentada, ya sea, glucosa, glicerol, ácidos grasos o su combinación. Una vez se calcularon los MEs, se analizó la longitud de las rutas obtenidas y la participación de las reacciones bioquímicas para cada uno de los casos planteados.

- **Análisis de variabilidad de flujo (*Flux Variability Analysis*, FVA)**

FVA es usado para evaluar el grado de flexibilidad de una red metabólica (Mahadevan & Schilling 2003) hallando los límites máximo y mínimo de todos los fluxes de las reacciones en estado estacionario (Mahadevan & Schilling 2003; Christina Smolke 2009; Gudmundsson & Thiele 2010), para una función objetivo determinada, por ejemplo la formación de biomasa. Los valores para los diferentes fluxes entre el máximo y mínimo obtenidos satisfacen las restricciones inicialmente impuestas.

El FVA ha sido usado en el estudio de la distribución de flujos bajo un crecimiento no óptimo (Reed & Palsson 2004), en el estudio de la flexibilidad y redundancia de una red (Francke et al. 2005; Thiele et al. 2010), en estudios de optimización de las condiciones de alimentación a un reactor para la producción de antibióticos (Bushell et al. 2006), y la investigación de las capacidades metabólicas de *M. tuberculosis* (Beste et al. 2007; Jamshidi & Palsson 2007).

El problema FVA se formula de la siguiente manera

$$\begin{aligned} & \max_v / \min_v v_i \\ & \text{sujeto a } Sv = 0 \\ & w^t v \geq Z_0 \\ & v_l \leq v \leq v_u \end{aligned} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde S es la matriz $m \times n$ de los coeficientes estequiométricos (siendo m es el número de metabolitos y n es el número de reacciones en la red), v es el vector que representa todos los flujos metabólicos (incluyendo flujo interno, flujo de transporte y flujo de crecimiento), W representa una función biológica como producción de biomasa o ATP y $Z_0 = W^T V_0$ es una solución óptima al problema de optimización en FBA.

2.2 Extensión del modelo al metabolismo de *M. tuberculosis* UT205

El aislado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* UT205 (en comparación con la cepa de referencia H37Rv) se caracteriza por una larga delección genómica de 3.6 kb que genera la pérdida y modificación de los genes *Rv1996* y *Rv1997* (Isaza et al. 2012). Aunque ambos genes se han definido como no esenciales para el crecimiento de H37Rv (Sasseti et al. 2003; Sasseti & Rubin 2003; Beste et al. 2009; Griffin et al. 2011) constituyen un primer factor diferenciador respecto del metabolismo asociado a la cepa estándar. El gen *Rv1996* codifica para la proteína relacionada con eventos metabólicos en respuesta al estrés (MT2052). *Rv1997* codifica para una enzima ATP asa tipo P; esta enzima, identificada en la pared celular, posiblemente cataliza el transporte de cationes metálicos, mediado por la hidrólisis de ATP (Mawuenyega et al. 2005).

La ausencia del gen *Rv1997* afecta de manera indirecta 13 reacciones enzimáticas tomadas en consideración en el mapa propuesto para *M. tuberculosis*. Todas las proteínas afectadas se encuentran asociadas a rutas del metabolismo central. En la tabla 2-1 se relacionan las enzimas, presentes en el mapa propuesto, dependientes de cationes metálicos.

2.2.1 Análisis de robustez.

En sistemas biológicos, la robustez es la capacidad que posee el organismo para mantener su funcionamiento normal a pesar de ser sometido a perturbaciones (internas o externas) (Kitano 2004). En redes metabólicas, la robustez puede relacionarse con el cambio en el flujo máximo de la función objetivo cuando se generan perturbaciones en el flujo óptimo de una reacción metabólica particular (Larhlimi et al. 2011)

La robustez en el mapa metabólico propuesto para el aislado clínico UT205, se determinó calculando el vector de flujos óptimo que maximiza la formación de biomasa y ácidos micólicos, usando una concentración de sustrato de $0.4 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$ (dato definido a partir de un trabajo pre-experimental *-in silico-* y de reporte de literatura) (Beste et al. 2007; Beste et al. 2011); este perfil de flujos se denominó "*In silico* silvestre". Se

generaron perturbaciones al disminuir el flujo en las reacciones (tabla 2-1) desde 100% a 0%.

Tabla 2-1: Enzimas dependientes de cationes metálicas en el mapa propuesto de *Mycobacterium tuberculosis*.

Ruta metabólica	Nombre	Proteína	Cofactor	Referencias
Glicolisis	6-fosfofructoquinasa	EC 2.7.1.11	Mg ²⁺	(Phong et al. 2013)
Gluconeogénesis	Fructosa-1,6-bifosfatasa II	EC 3.1.3.11	Mn ²⁺	(Movahedzadeh et al. 2004)
Glicolisis Gluconeogénesis	Fructosa-bifosfato aldolasa	EC 4.1.2.13	Zn ²⁺	(Ramsaywak et al. 2004; Rukseree et al. 2008)
Glicolisis Gluconeogénesis	Enolasa	EC 4.2.1.11	Mg ²⁺	(Kelkar et al. 2011)
Glicolisis	Piruvato quinasa	EC 2.7.1.40	Mg ²⁺	(Chavadi et al. 2009; Arora et al. 2010)
	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	EC 4.1.1.32	Mg ²⁺ o Mn ²⁺	(Liu et al. 2006)
Anaplerotica	Malato oxidoreductasa	EC 1.1.1.38	Cationes divalentes con preferencia por Mg ²⁺ o Mn ²⁺	(Kelkar et al. 2011)
	Ribulosa-fosfato 3-epimerasa	EC 5.1.3.1	Activa con Co ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , y Zn ²⁺	(Kelkar et al. 2011)
Pentosas fosfato	Transcetolasa	EC 2.2.1.1	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ con preferencia por Mg ²⁺	(Fullam et al. 2012)
	Isocitrato deshidrogenasa	EC 1.1.1.42	Mg ²⁺ o Mn ²⁺	(Banerjee et al. 2005)
Ciclo de ácidos tricarboxílicos	Alfa-Cetoglutarato ferredoxin oxidoreductasa	EC 1.2.7.3	Mg ²⁺	(Baughn et al. 2009)
	Succinil-CoA sintetasa	EC 6.2.1.5	Mg ²⁺ o Mn ²⁺	(Kelkar et al. 2011)
Glioxilato	Malato sintasa	EC 2.3.3.9	Mg ²⁺ o Mn ²⁺	(Anstrom & Remington 2006; Krieger et al. 2012)

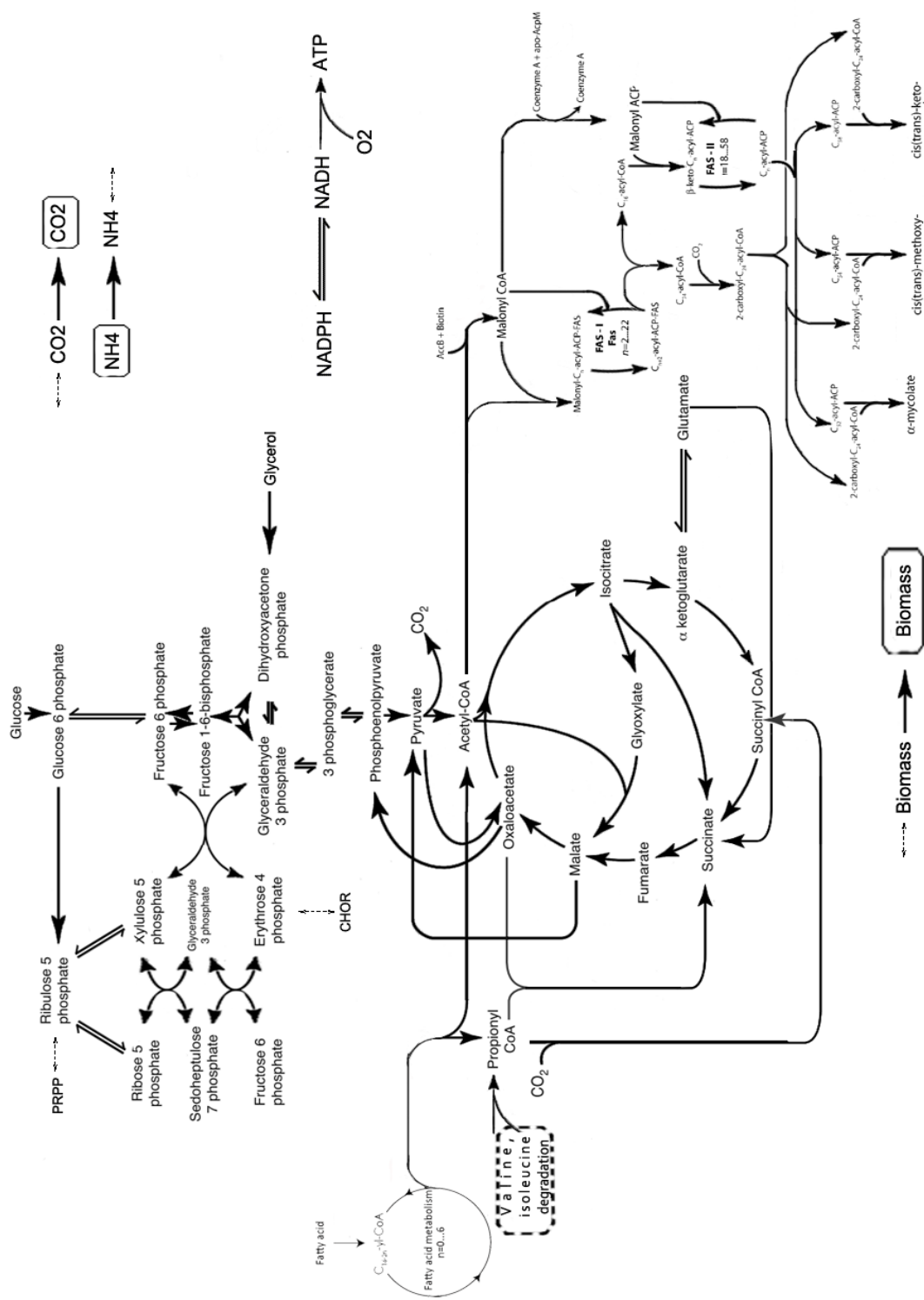


Figura 2-1: Mapa metabólico simplificado de *Mycobacterium tuberculosis*.

3. Resultados y discusión

El mapa metabólico propuesto compila 336 reacciones en 100 fluxes y 82 metabolitos, representativos de las redes metabólicas de glicolisis/gluconeogénesis, pentosas fosfato, ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA), *Shunt* de glioxilato, rutas anapleróticas asociadas al metabolismo central del carbono y rutas asociadas a la síntesis de ácidos micólicos. Además, se incluyeron reacciones asociadas a la formación de aminoácidos y degradación de ácidos grasos. En la Figura 3-1 se muestra la participación de las reacciones del modelo en las diferentes redes metabólicas. Como se observa, cerca del 50% de las reacciones consideradas hacen parte de eventos metabólicos asociados a la síntesis de moléculas/macromoléculas. Se resalta además la presencia de un gran número de reacciones anapleróticas propias del metabolismo de *M. tuberculosis*, especialmente útiles durante el proceso infeccioso.

3.1 Validación

Beste y colaboradores. (2011) usó una aproximación que combina ensayos experimentales a partir de sustrato marcados isotópicamente y análisis computacional para estudiar el metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*. En su trabajo, los autores demostraron que el gen *icl1* es esencial para el crecimiento de la micobacteria en un medio con glicerol como fuente de carbono. El gen *icl1* está involucrado en el ciclo del glioxilato y es necesario para la persistencia y virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*; las bacterias carentes de este gen son incapaces de crecer en acetato, ácidos grasos o dentro de macrófagos (Höner Zu Bentrup et al. 1999; Muñoz-Elías & McKinney 2005; Gould et al. 2006; Muñoz-Elías et al. 2006). De igual forma, los autores demostraron que *M. tuberculosis* es capaz de crecer a expensas de bajos niveles de CO₂ como fuente de carbono.

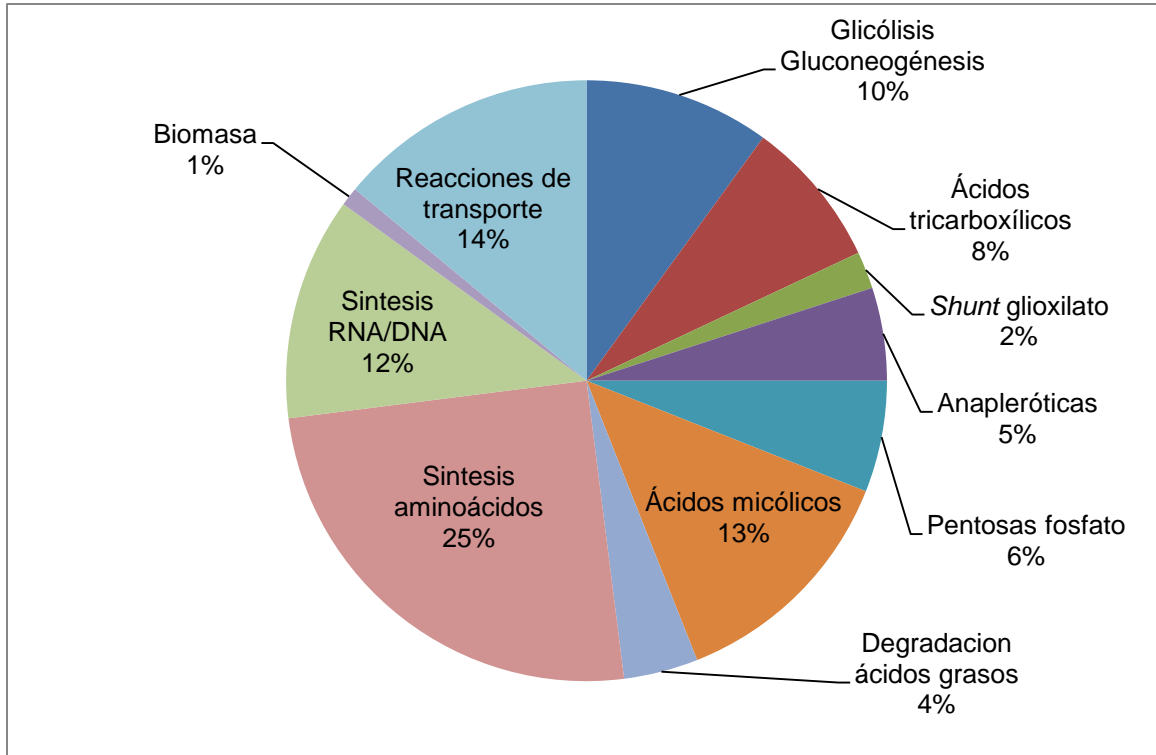


Figura 3-1: Porcentaje de participación de las reacciones del modelo en las diferentes redes metabólicas

Al realizar un análisis comparativo (Figura 3-2) entre la actividad metabólica representada por el modelo aquí propuesto, y los resultados experimentales reportados por Beste (2011), se observan comportamientos similares en cuanto a la distribución del flujo de carbono a lo largo de las rutas bioquímicas asociadas al metabolismo central (Glicólisis/gluconeogénesis, pentosas fosfato, ácidos tricarbónicos y el *Shunt* de glioxilato).

Los valores negativos de algunos fluxes se presentan dada la direccionalidad de la reacciones, inicialmente asignada, y es observable solo en reacciones reversibles. Es así como, la reacción reversible mediada por la enzima *Glucosa 6 fosfato isomerasa* se fija en el modelo con una dirección de conversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato; el valor negativo del flux respectivo, muestra que la dirección de conversión va en sentido de fructosa-6-fosfato a glucosa-6-fosfato. De igual forma, el modelo representa la carboxilación de fosfoenolpiruvato para producir oxaloacetato, mediado por la enzima

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK), comportamiento similar al reportado por Beste (2011). Cuando la bacteria utiliza glicerol como sustrato, la participación activa del sistema de reacciones asociadas a la ruta de la gluconeogénesis es evidente.

Para los casos en los que se presenta una discrepancia en la magnitud de los flujos entre el modelo aquí propuesto y los valores obtenidos en el trabajo de Beste (2011), se debe principalmente a la topología de la red considerada. Beste utiliza 75 reacciones, todas ellas asociadas al metabolismo central, mientras el modelo aquí propuesto contempla 100 reacciones que representan tanto la actividad catabólica como anabólica del sistema celular. No obstante, el modelo contempla más alternativas de distribución del carbono alimentado, a partir de un análisis comparativo, se observan patrones de flujo similares a los reportados en el trabajo de Beste (2011).

En la figura 3-2 se observa un bajo flux de carbono a través de la ruta gluconeogénica y posteriormente hacia pentosa fosfato. El mayor flux de carbono tiene lugar a través de la ruta glucolítica en un 95%. De igual forma, la actividad anaplerótica también se ve favorecida y con ello la síntesis de ácidos micólicos; el balance de carbono da cuenta de una restricción en el flujo de carbonos hacia el ciclo de ácidos tricarboxílicos y una disminución en la síntesis de α -cetoglutarato y glutamato.

De otra parte, la enzima Enoil-AcpM reductasa (InhA), blanco metabólico de los fármacos Isoniazida y Etionamida, y la enzima FASI, responsable de la síntesis de ácido palmítico, principalmente e inhibida por Pirazinamida, han demostrado ser esenciales en la formación de ácidos micólicos (Raman et al. 2005) y en el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (Beste et al. 2007; Jamshidi y Palsson 2007). Al simular el efecto adverso de la pérdida de actividad de estas enzimas sobre el crecimiento de la bacteria en general, se observa que el modelo propuesto predice los efectos de los dos fármacos sobre la actividad metabólica de Mtb. En la figura 3-3 se presentan los resultados de la validación del modelo por inhibición de la mega-proteína FASI. Al inhibir FASI se imposibilita la formación de C₁₆-acil-CoA evitando la elongación de las cadenas de ácidos grasos, mediante la acción catalítica de FASII. Así mismo, se impide la formación de C₂₄-acil-CoA, metabolito necesario para la formación de los ácidos micólicos. De igual manera, en la figura 3-4 se presenta los resultados de los ensayos de validación del modelo cuando se inhibe la enzima InhA en el complejo proteico FASII; esta enzima cataliza el último

pasó en la elongación de las cadenas de ácidos grasos en el complejo multi-proteico FASII. Al inhibir la expresión de esta enzima (InhA), se impide la formación de C₅₂-acil-ACP, C₅₄-acil-ACP y C₅₈-acil-ACP, precursores anabólicos de α -micolato, metoxi-micolato y ceto-micolato, respectivamente.

3.1.1 Estados metabólicos extremos.

Son estados fisiológicos que pueden presentarse en el crecimiento de la micobacteria durante el proceso de infección; se estudian con el fin de observar como es la distribución de flujo de carbono cuando la función objetivo es la formación de biomasa o la formación de ácidos micólicos, de manera única. En el estudio de los eventos extremos se modificó la ecuación de formación de biomasa para considerar o no la síntesis de ácidos micólicos, primer y segundo evento, respectivamente.

Al considerar la formación de biomasa como única función objetivo del problema de optimización, y utilizando como sustrato tres fuentes de carbono (glucosa, glicerol y ácidos grasos de cadenas pares e impares) de forma individual, se observó un flujo de carbono nulo a lo largo de las reacciones involucradas en la formación de ácidos micólicos, independiente del tipo de sustrato (Anexo B). De manera similar, al considerar la formación de ácidos micólicos como única función objetivo, se observó que el flujo de carbono en las reacciones asociadas a la formación de biomasa tiene un flujo neto de cero. Ambos eventos constituyen un estado del sistema celular no factible y solo son el resultado de la solución del problema de optimización a partir de *CellNetAnalyzer*. Los resultados se presentan en el Anexo B.

En el Anexo B, se presentan los resultados del análisis de flujos de carbono para ambos casos. Al considerar la distribución de fluxes en las reacciones no asociadas a la síntesis de ácidos micólicos o reacciones del metabolismo central, se observa que a partir de glucosa como único sustrato, carbono fluye mayoritariamente hacia la ruta de pentosas fosfato buscando proveer al sistema celular de precursores importante de biomasa y principalmente contrarrestar una posible deficiencia en NADP(H); posteriormente, el remanente de carbono se reincorpora a la ruta de la glicolisis, a la altura de los metabolitos intermediarios fructosa 6 fosfato y gliceraldehído 3 fosfato. Cuando se restringe la fuente de carbono solamente a glicerol, se observa una distribución de

carbono que mayoritariamente favorece la ruta glucolítica, aproximadamente tres cuartas partes del carbono total alimentado; el carbono restante es metabolizado en las reacciones asociadas a la gluconeogénesis para proveer a la célula de metabolitos intermediarios importantes como glucosa y/o glucosa-6-fosfato.

3.1.2 Simulación de diferentes eventos metabólicos

Al utilizar glicerol y glucosa como fuentes de carbono, se observó que la solución al problema de optimización (usando *CellNetAnalyzer*) requirió una velocidad de consumo de glicerol equivalente a $100 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$ (máximo permitido atendiendo a las restricciones impuestas al modelo); a su vez, el consumo de glucosa correspondió a $25.34 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$. Simulaciones adicionales permitieron identificar el límite máximo para la velocidad de consumo de glucosa ($60 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$ de glucosa); valores superiores conllevan a resultados erróneos e inconsistentes no representativos de la actividad del microorganismo, debido principalmente a las características topológicas de la red. Con el fin de verificar que estos valores no se presentaron por una posible inhibición por sustrato, las restricciones a imponer se cambiaron de 100 unidades a 200 unidades; de igual manera *CellNetAnalyzer* calculó la velocidad de consumo de glicerol como el valor máximo permitido (a partir de las restricciones); la relación entre los valores máximos de las velocidades de consumo de glucosa se mantuvieron, en este caso $200 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$ y $120 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente. Es de aclarar que estos valores atienden a la solución de un problema computacional y no constituyen restricciones posibles de obtener a nivel biológico.

De manera similar, la solución al problema de optimización cuando se utiliza glicerol y cadenas de ácidos grasos como fuentes de carbono, permitió identificar preferencias en el consumo de glicerol con respecto al consumo de acetil-CoA, proveniente de la β -oxidación de las cadenas de ácidos grasos pares e impares. Es así como un 94% del carbono asimilado proviene de la asimilación del glicerol y solo un 6% proviene de la β -oxidación.

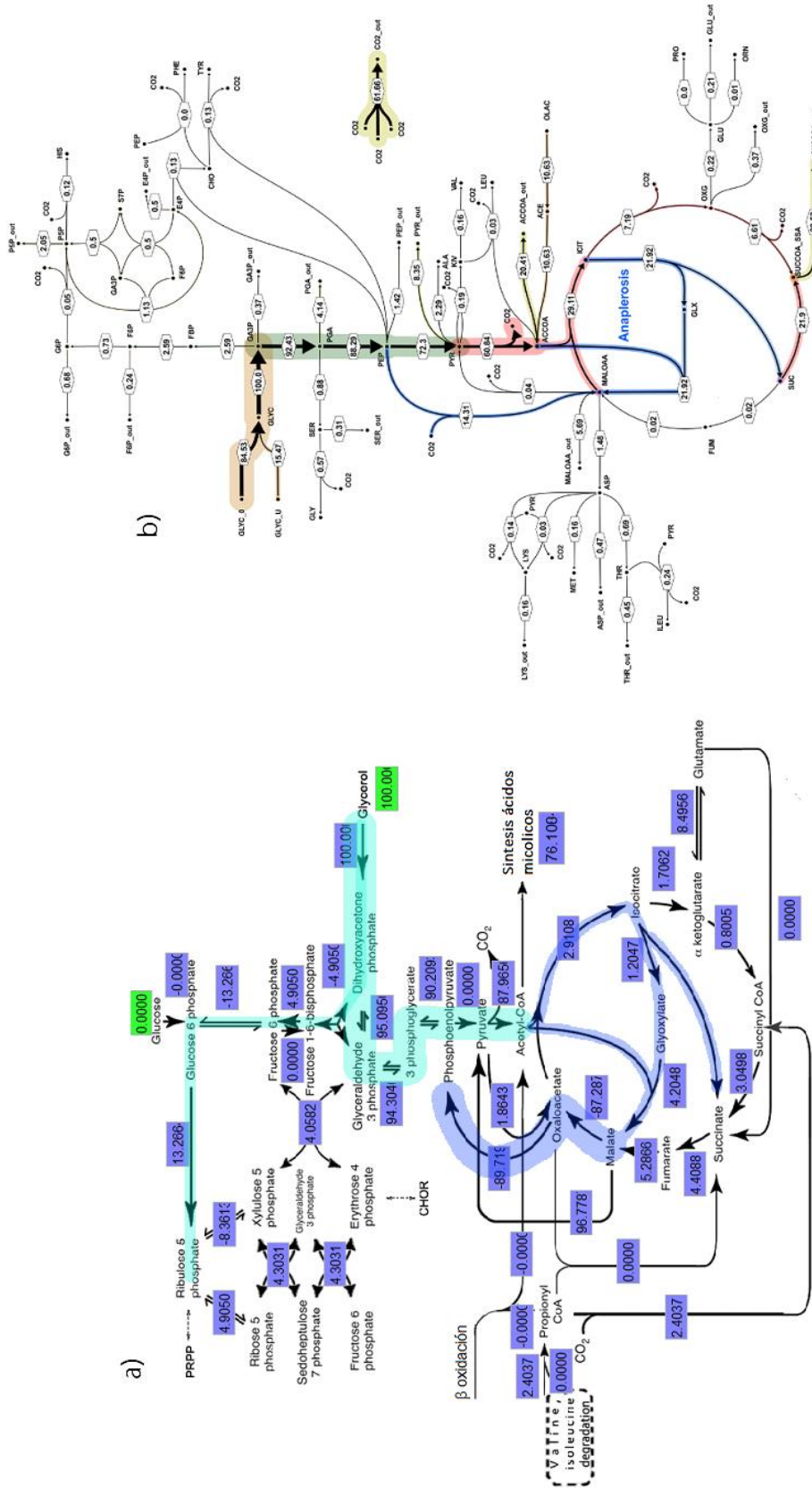


Figura 3-2: Validación del modelo por comparación con la literatura. a) mapa metabólico simplificado de *M. tuberculosis*., b) mapa de flujos metabólicos obtenidos por ¹³C-MFA (Beste et al. 2011). Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glicerol y se le otorgó arbitrariamente el valor de 100 mmol g-DW⁻¹h⁻¹. Glicolisis/Gluconeogénesis y Pentosas fosfato (cian), rutas anapleróticas (azul), el ancho de cada línea es proporcional al valor de flujo correspondiente.

El comportamiento observado es similar al reportado por de Carvalho (2010), en el cual *Mycobacterium tuberculosis* asimila de manera preferencial carbono desde glicerol, como fuente principal de carbono, luego desde hexosas y por último utiliza acetil-CoA ante la ausencia de las demás fuentes. Este carácter selectivo de Mtb para vivir a expensas del sustrato disponible, (dos, tres o seis carbonos), es un aspecto de gran trascendencia para su supervivencia durante el proceso infeccioso. Como ha sido documentado, ante las condiciones adversas en cuanto limitación de nutrientes a las que se ve expuesto el microorganismo durante el proceso infeccioso, este se ve abocado a usar triacilglicérols presentes en el hospedero, dando lugar a una condición de aparente dormancia (Daniel J., 2011)

Es de anotar que para ambos casos la velocidad de formación de biomasa a partir del modelo, muestra sensibilidad a los flujos de consumo de sustrato; a partir de los resultados de simulación, las mejores condiciones para obtener un máximo de biomasa demandan que la cantidad de sustrato suministrado deba ser 100 mmol g-DW⁻¹h⁻¹ de glicerol y 25.34 unidades de glucosa o 85.50 mmol g-DW⁻¹h⁻¹ de glicerol, 13.78 unidades de ácidos grasos de cadenas pares y 11.42 unidades de cadenas de ácidos grasos impares. Estos valores de concentración dan cuenta de los altos niveles de acumulación de biomasa, no necesariamente posibles al interior del macrófago que contiene la bacteria.

3.1.3 Robustez del modelo

En sistemas biológicos, la robustez es la capacidad que posee el organismo para mantener su funcionamiento normal, a pesar de ser sometido a perturbaciones de tipo nutricional y/o medioambiental (internas o externas) (Kitano 2004). El tratamiento experimental *In silico*, contempló el efecto de la variación en la concentración glucosa y glicerol como sustrato, sobre el crecimiento de biomasa (función objetivo). Para este propósito, se generaron incrementos del 20%, (porcentaje asignado luego de ensayos de simulación pre-experimental), en la concentración de glucosa y glicerol como sustratos, de manera independiente. En la Figura 3-5 se observa la variación de la concentración de biomasa (función objetivo), como función de perturbaciones en la concentración de sustrato.

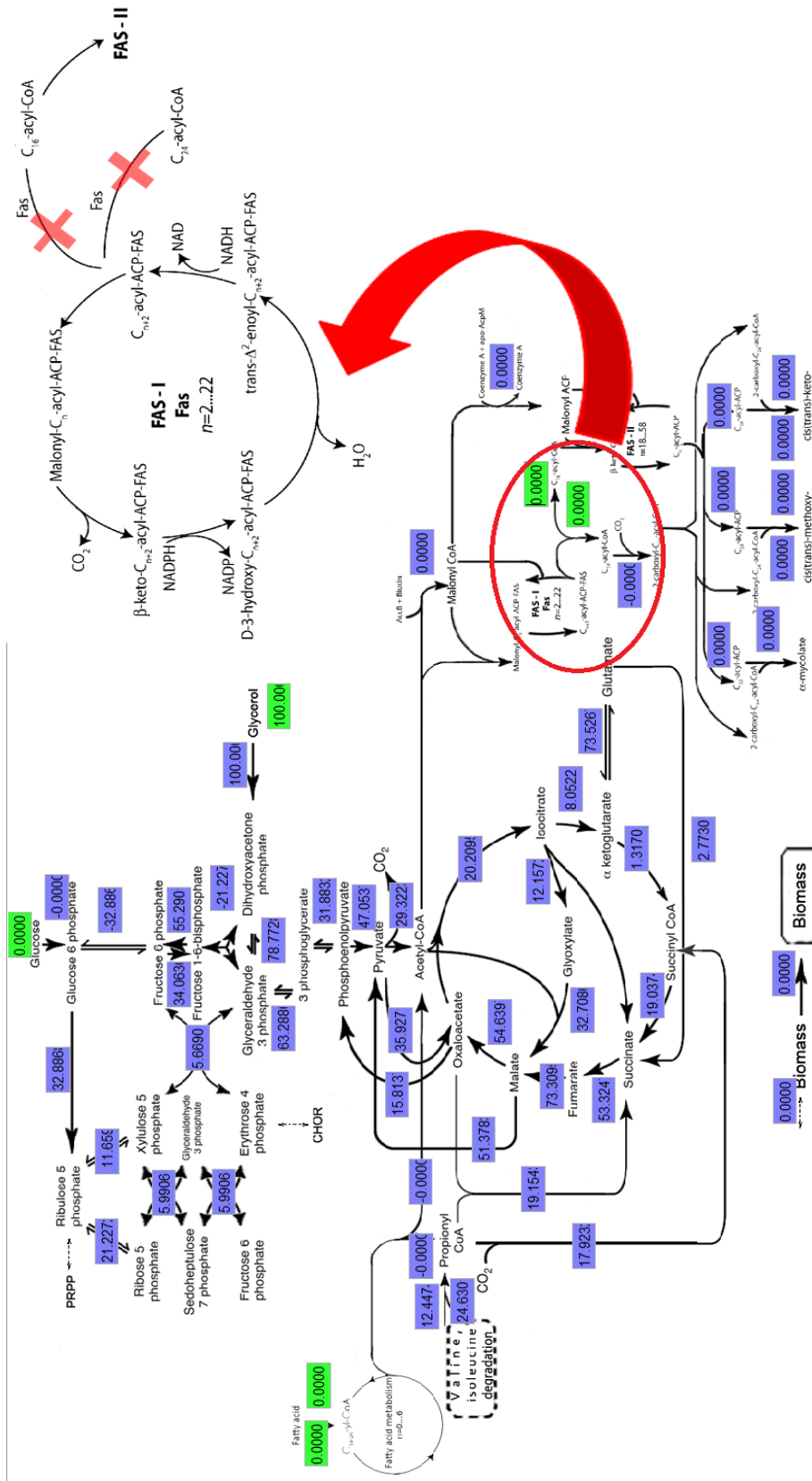


Figura 3-3: Validación del modelo por inhibición de la mega-proteína FAS-I por el fármaco Pirazinamida. Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glicerol y se le otorgo arbitrariamente el valor de 100 mmol g-DW⁻¹h⁻¹.

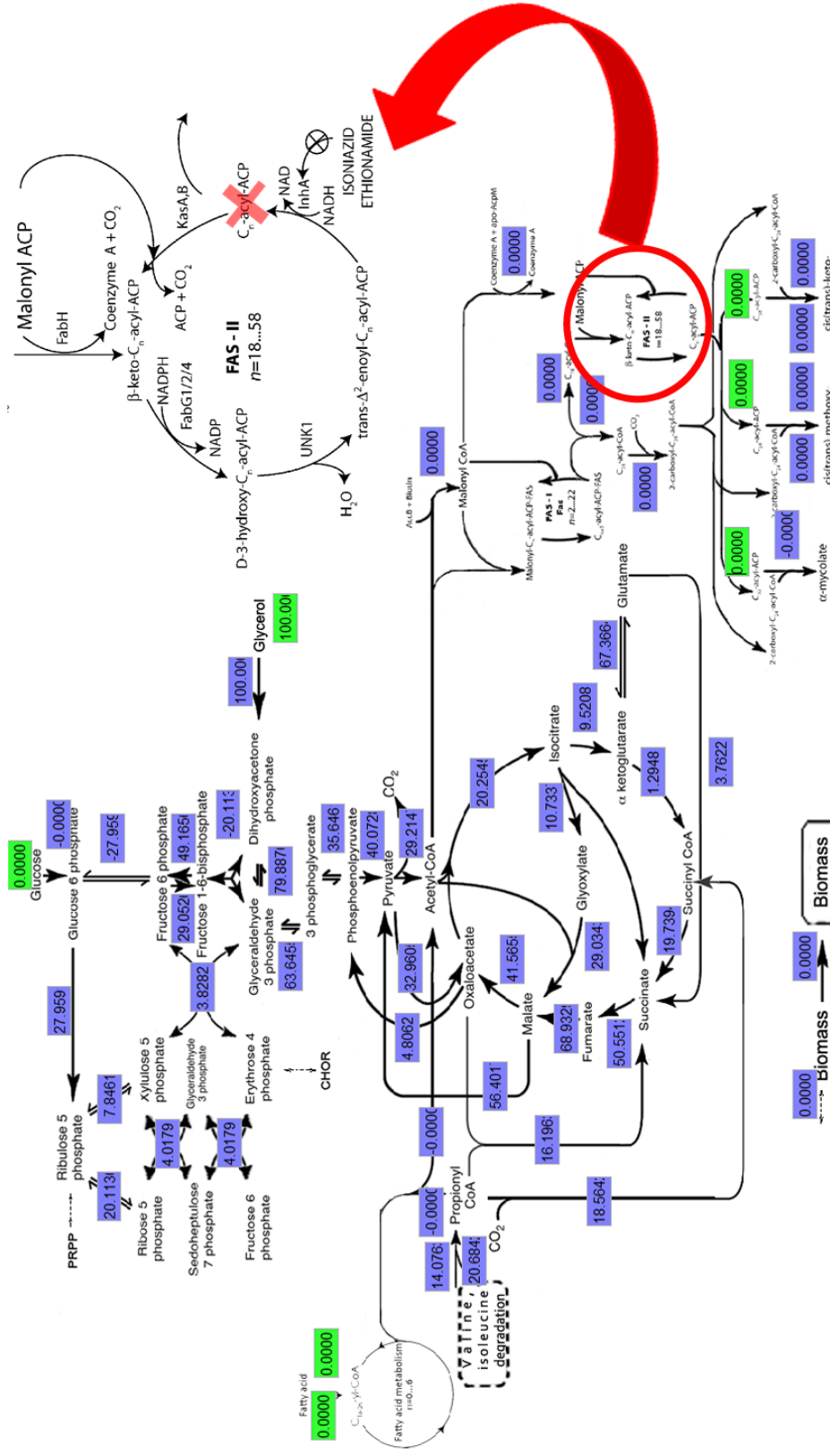


Figura 3-4: Validación del modelo por inhibición de InhA en el complejo proteico FASII por los fármacos Isoniazida y Etonamida. Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glicerol y se le otorgo arbitrariamente el valor de 100 mmol g-DW⁻¹h⁻¹.

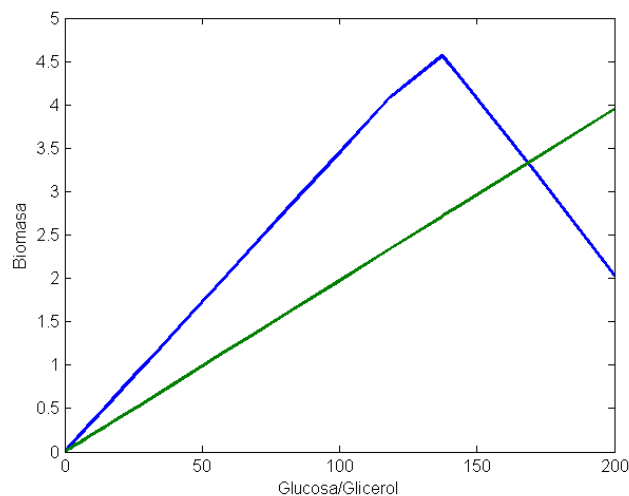


Figura 3-5: Análisis de robustez. Formación de biomasa a partir del consumo de glucosa (línea azul); formación de biomasa a partir de consumo de glicerol (línea verde). Los valores de la gráfica se encuentran en $\text{mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$ para el sustrato y g-DW para la biomasa.

A partir del análisis de robustez se observa que las perturbaciones generadas en la concentración de sustrato, tanto para glucosa como para glicerol, generan incrementos en la concentración de biomasa, siguiendo un comportamiento lineal; a mayor concentración de sustrato, mayor biomasa obtenida. Para el intervalo de valores de sustrato estudiados, el comportamiento es creciente; para el caso de glucosa como sustrato, el modelo prevé un efecto de inhibición por sustrato a partir de una concentración de aprox. $140 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$. Este comportamiento no se observa para las concentraciones de glicerol estudiadas.

La diferencia en las pendientes como resultado de la variación en la concentración de biomasa, cuando aumenta la concentración de sustrato, está dada por las diferencias en la actividad catabólica asociada a cada sustrato y a la cantidad de carbono que puede aportar cada una de las moléculas para la formación de biomasa (Glucosa 6 carbonos, Glicerol 3 carbonos). Es claro que la velocidad de formación de biomasa es mayor cuando la célula dispone plenamente de hexosas, que cuando asimila exclusivamente moléculas de tres carbonos. A partir de los resultados de simulación, para las condiciones definidas, específicamente las relacionadas con las restricciones impuestas,

el modelo presenta un grado aceptable de robustez. Las perturbaciones realizadas en la reacción no generan inconsistencias o cambios erráticos observables en la formación de biomasa.

3.1.4 Modos Elementales (MEs)

Para calcular los modos elementales (MEs) se usó la rutina incorporada en *CellNetAnalyzer*. El análisis contempló cuatro instancias definidas por la variación en la fuente de carbono con la cual se alimenta el modelo (glucosa, glicerol, ácidos grasos y todas las fuentes anteriores). Calculados los MEs se analizan la longitud de las rutas obtenidas y la participación de las reacciones bioquímicas para cada uno de los casos planteados.

Tabla 3-1: Computo de modos elementales en cuatro modelos propuestos

Sustrato	Glucosa	Glicerol	Ácidos grasos	Glucosa, Glicerol, Ácidos grasos
Productos		Biomasa y Ácidos micólicos		
Numero reacciones	94	94	96	100
numero metabolitos	79	79	80	82
Compresión de la red:				
Numero reacciones	37(14 reversibles)	36(13 reversibles)	36(12 reversibles)	41(15 reversibles)
Numero metabolitos	22	21	20	41
Numero de modos elementales	26305	17233	21173	480191
Tiempo de computación	383.438seg	170.938seg	164.844seg	251.853.281seg

La complejidad de cada uno de los sub-modelos aumenta al introducir más reacciones que suministren fuentes de carbono, esto es evidente al observar el tiempo de cómputo y el número de modos elementales para cada una de las variaciones en el modelo.

En todos los casos la longitud en los modos elementales que promueve el crecimiento o generación de biomasa y ácidos micólicos en los modelos se aproxima a las 80 reacciones (Figura 3-6).

De igual forma en todos los sub-modelos se observó que más del 90 % de los modos elementales hallados promueven la formación de biomasa y la síntesis de ácidos micólicos.

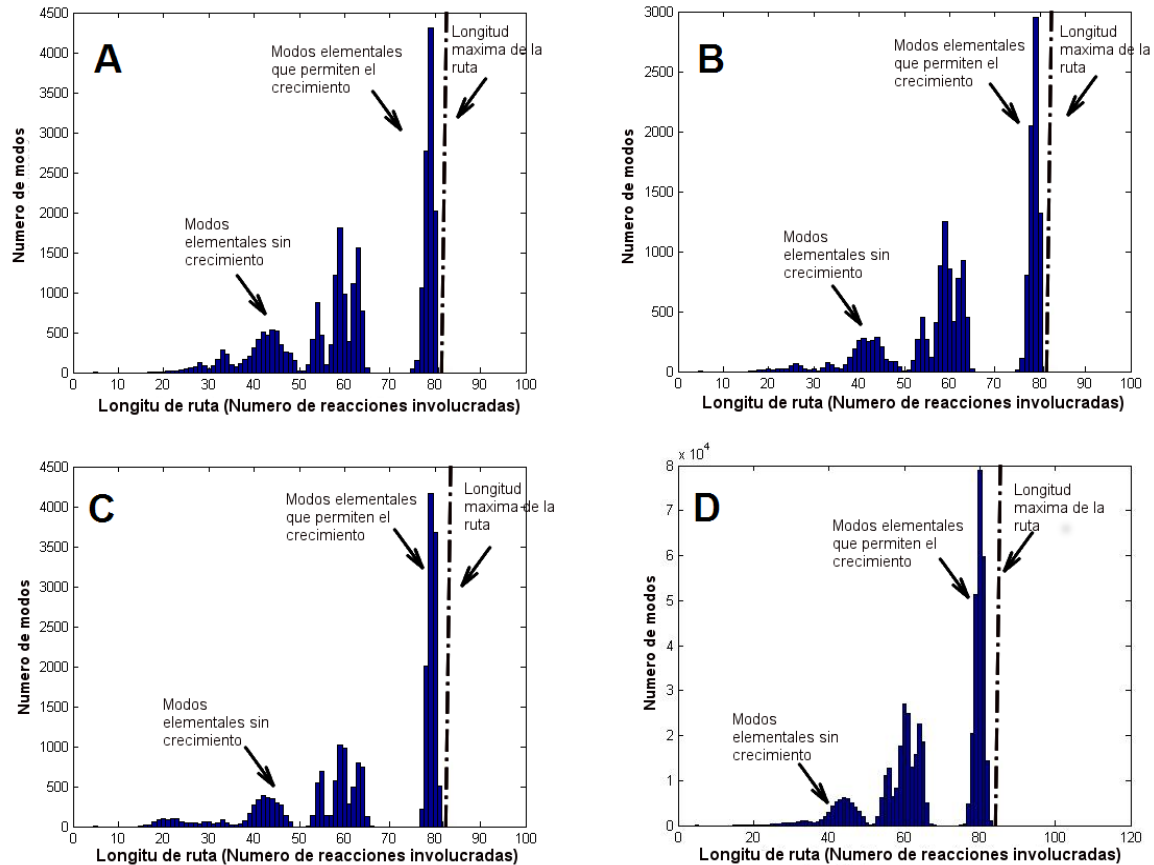


Figura 3-6: Histogramas longitud de las rutas para los modos elementales suministrando como fuente de carbono A) Glucosa, B) Glicerol, C) Ácidos grasos y D) todas las anteriores fuentes de carbono

Participación de reacciones

En las rutas bioquímicas de glicolisis/gluconeogénesis, ácidos tricarbóxicos y rutas anapleróticas se observó una participación de las reacciones concordante con el comportamiento observado en simulaciones previas; así por ejemplo, en las reacciones catalizadas por 6-fosfofructoquinasa y fructosa-1,6-bifosfatasa, cuando el sustrato es glucosa la 6-fosfofructoquinasa tiene una participación mayor (82%) que fructosa-1,6-bifosfatasa (14%); el caso contrario se presenta cuando la fuente de carbono es glicerol o ácidos grasos.

En las reacciones involucradas en la síntesis de ácidos micólicos sufren un incremento en su participación de un 10% cuando la fuente de carbono son ácidos grasos en comparación cuando la fuente es glucosa y solo de un 8% cuando es glicerol, esto debido a que las reacción de β -oxidación de ácidos grasos aporta una mayor cantidad de Acetil-CoA componente importante y que da inicio a la síntesis de ácidos micólicos. De igual forma las reacciones del *shunt* (o derivación) de glioxilato aumentan su participación cuando la fuente de carbono son ácidos micólicos.

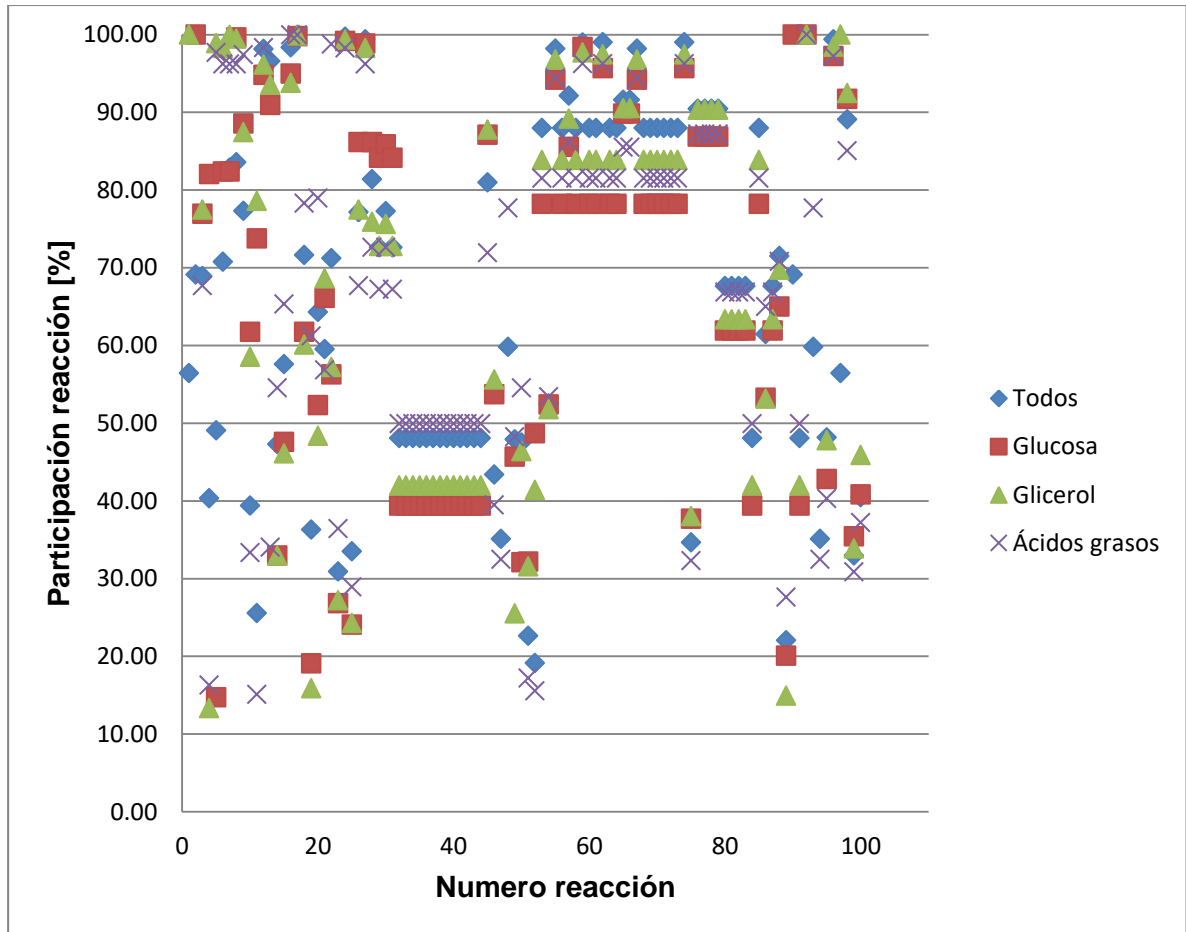


Figura 3-7: Participación de las reacciones para todos los sub-modelos

3.1.5 Análisis de variabilidad de flujo (*Flux Variability Analysis, FVA*)

Con el fin de determinar la capacidad del modelo propuesto para representar el metabolismo de *M. tuberculosis*, se calcularon los flujos máximos y mínimos por medio

de la rutina proporcionada por el programa *CellNetAnalyser*. Los rangos obtenidos en la mayoría de las reacciones se asemejan a lo observado en simulaciones anteriores; sin embargo, algunas reacciones presentan un flux máximo por debajo del observado en simulaciones anteriores, entre estas se encuentran algunas reacciones de síntesis de amino ácidos (asparagina, lisina, metionina, histidina, triptófano y tirosina). En Anexo E se observan los valores máximos y mínimos de los fluxes obtenidos para cada una de las reacciones incluidas en el modelo metabólico.

Aunque los fluxes máximos para las reacciones implicadas en la síntesis de ácidos micólicos son bajos (varían entre 0.08% y 4% del carbono suministrado) se encuentran acorde a lo expresado en la literatura (Raman et al. 2005; Beste et al. 2007), donde la composición en masa de estos ácidos micólicos es baja; es de recordar que estos ácidos grasos son cadenas de gran tamaño (entre 52-58 carbonos).

Al realizar el análisis de variabilidad de flujo se encuentra que los aminoácidos glutamina/glutamato y asparagina/aspartato que contribuyen al crecimiento celular se encuentran que para las restricciones impuestas al modelo, el máximo flujo permisible es aproximadamente un 2% del carbono suministrado como sustrato, implicando una aparente deficiencia en el crecimiento debido a las bajas concentraciones de estos aminoácidos. Beste y col en el 2013, haciendo uso de sustratos marcados isotópicamente (^{13}C) realizaron un análisis de flujos entre el hospedero (macrófago) y *M. tuberculosis* encontrando que la bacteria *In vivo* importa del hospedero aminoácidos como alanina, glutamina/glutamato y asparagina/aspartato posiblemente con la finalidad de suplir la deficiencia.

3.2 Extensión del modelo matemático para representar el metabolismo de *M. tuberculosis*, aislado clínico UT205.

La deleción genómica de 3.6 kb presente en el aislado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* UT205 no afecta el número de reacciones presentes en el modelo propuesto. La deleción principalmente genera la pérdida de los genes *Rv1996* y *Rv1997*; el gen *Rv1996* codifica para la proteína relacionada con eventos metabólicos en respuesta al estrés (MT2052). *Rv1997* codifica para una enzima ATP asa tipo P ubicada en la pared celular y posiblemente cataliza el transporte de cationes metálicos, mediado

por la hidrólisis de ATP (Mawuenyega et al. 2005); la ausencia de esta ATP así afecta 13 reacciones asociadas a las rutas de Glicolisis/Gluconeogénesis y ácidos tricarbónicos (Tabla 2-1).

Atendiendo al estudio realizado por Isaza y col en el 2012, el aislado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* UT205 no presenta diferencias significativas en su metaboloma al ser comparado con la cepa de referencia H37Rv.

La extensión del modelo desarrollado para representar el metabolismo del aislado clínico, y la topología de las redes obtenidas, no permiten identificar diferencias significativas a nivel metabólico entre la cepa de referencia H37Rv y el aislado clínico UT205

3.2.1 Análisis de distribución de fluxes

En esta sección se analiza el comportamiento de sistema celular cuando su maquinaria metabólica es modificada para atender a las limitaciones propias del aislado clínico UT205. Específicamente, el tratamiento experimental *In silico* considera perturbaciones a la topología de la red de la cepa estándar, como resultado de modificaciones en la red atendiendo a las diferencias a nivel genómico, ya reportadas en literatura.

Simulando un medio mínimo de glicerol para el crecimiento de *M. tuberculosis*, se restringió el flujo de alimentación de glicerol a $0.4 \text{ mmol g-DW}^{-1}\text{h}^{-1}$ y se determinó la robustez de la red metabólica a los cambios en los flujos de las reacciones afectadas por la ausencia del gen *Rv1997* (tabla 2-1). Las reacciones asociadas a las enzimas 6-fosfofructoquinasa y piruvato quinasa presentan una velocidad de reacción nula (Ver Anexo C); estas enzimas hacen parte de la ruta de la glicolisis y, aun cuando no se realizaron perturbaciones sobre ellas, se observó su comportamiento durante las diferentes simulaciones.

La completa distribución de flujos metabólicos generados a partir de las perturbaciones realizadas se presenta en el Anexo C. A continuación, se analiza el comportamiento del sistema celular considerando variaciones fenotípicas como resultado de cambios a nivel enzimático.

▪ Fructosa bifosfato aldolasa

La enzima fructosa bifosfato aldolasa cataliza la condensación aldólica reversible de gliceraldehído 3 fosfato y dihidroxiacetona fosfato para formar fructosa 1,6 bifosfato, en la ruta gluconeogénica. El gen *fba/fda* de *M. tuberculosis* codifica para la enzima Fructosa bifosfato aldolasa clase II que requiere de un ion metálico divalente (Zn^{2+}) para polarizar el grupo carbonilo del sustrato y estabilizar el carbanión intermediario (Ramsaywak et al. 2004; Rukseree et al. 2008).

Se determinó que la capacidad de la red metabólica para mantener la formación de biomasa y ácidos micólicos no registra cambios para flujos metabólicos tan bajos como el 22% de “*In silico* silvestre”. La disminución por debajo de 21% conlleva a la activación de las reacciones catalizadas por 6-fosfofructoquinasa y piruvato quinasa en la ruta glucolítica, a la activación de la ruta de degradación de isoleucina y a la inactivación de la fosfoglucomutasa (*pgi*). La falta de flujo de carbono en *pgi* genera un cambio en la direccionalidad de los flujos metabólicos en la ruta pentosa fosfato con el fin de suplir los metabolitos necesarios para la formación de algunos aminoácidos y precursores de biomasa. De igual forma, se inactiva el flujo en glucosa 6 fosfato deshidrogenasa lo que ocasiona una disminución del potencial redox (NADPH) necesario para la actividad biosintética; el modelo suple esta disminución aumentando el flujo de carbono en la ruta de los ácidos tricarbónicos lo que aumenta la producción de NADH, la cual, mediante la enzima transdeshidrogenasa se transforma en NADPH.

La inactivación de la enzima, en el modelo propuesto, produce la muerte celular (flujo de formación de biomasa y ácidos micólicos igual a cero). Este comportamiento concuerda con lo reportado por Beste (2009), en el cual el gen *Rv0363c* que codifica para la enzima fructosa bifosfato aldolasa es esencial para que la micobacteria crezca en un medio mínimo con glicerol.

▪ Fructosa 1,6 bifosfatasa

La fructosa 1,6 bifosfatasa es una enzima clave en la ruta de la gluconeogénesis; cataliza de forma unidireccional la hidrólisis de fructosa 1,6 bifosfato en fructosa 6 fosfato. La mayoría de enzimas siguen una cinética tipo Michaelis-Menten a pH fisiológico y

generalmente requieren de un ion metálico divalente (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+}) para su actividad catalítica (Kelley-Loughnane et al. 2002; Verhees et al. 2002).

En la ruta de la gluconeogénesis la fructosa 1,6 bifosfatasa requiere como sustrato el producto de la catálisis de la fructosa bifosfato aldolasa, esto hace que al disminuir el flujo en la enzima se generen distribuciones de flujo de carbono iguales.

▪ Enolasa

Enolasa o 2 fosfo-D-glicerato hidrolasa, es la primera de una serie de enzimas que comparten las rutas de glucolisis y gluconeogénesis (Dannelly & Reeves 1988). La enolasa (*eno*) es una enzima dimérica que cataliza la deshidratación de 2 fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato, requiere de catión divalente metálico (Mg^{2+}) para la catálisis y la estabilización de los dímeros (Lebioda et al. 1989; Han et al. 2012).

El modelo presenta una alta sensibilidad a las perturbaciones generadas sobre los flujos de la enzima enolasa; la formación de biomasa y de ácidos micólicos registran cambios en flujos tan altos como el 80% de "*In silico* silvestre". Sin embargo, al restringir completamente el flujo mediado por esta enzima (flujo 0%) el modelo aun presenta formación de biomasa y ácidos micólicos, comportamiento que concuerda con lo reportado por Beste (2009) donde el gen *Rv1023* no es necesario para el crecimiento en un medio mínimo de glicerol; no obstante, en un medio mínimo con glucosa, este gen es esencial para el crecimiento de biomasa (Sasseti et al. 2003).

▪ Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa cataliza la descarboxilación y fosforilación reversible del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato. La enzima es dependiente de mononucleótidos y cationes divalentes como el Mg^{2+} o Mn^{2+} , estos cationes hacen parte de la esfera de coordinación que colabora en la unión del sustrato y la catálisis enzimática (Matte et al. 1997).

Al igual que en el caso de la enolasa, el modelo presentó sensibilidad a los cambios efectuados en los flujos de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, en valores tan

altos como el 80%. El modelo presentó una mayor formación de biomasa y ácidos micólicos cuando el flujo en la enzima se restringe a 0% comparado con el perfil de flujos generado al perturbar la enolasa; sin embargo, y al igual que la enolasa, no es una enzima esencial para el crecimiento de la micobacteria.

- **Enzima málica (mez)**

Malato deshidrogenasa (descarboxilando) o malato oxidoreductasa, juega un papel importante en la provisión de NAD(P)H tanto para la biosíntesis en *novo* y la desaturación de ácidos grasos (Wynn & Ratledge 1997). Es una enzima homotetramérica encargada de la descarboxilación de malato a piruvato y CO₂ con la reducción de NAD(P)⁺ a NAD(P)H; requiere de un ion metálico divalente (Mg²⁺ o Mn²⁺) para la catálisis (Hsu 1982; Edens et al. 1997; Yang et al. 2014).

El modelo no presentó cambios en la formación de biomasa y ácidos micólicos para flujos en la enzima málica tan bajos como el 20% de “*In silico* silvestre”. A partir de este valor, la disminución en el flujo generó una reducción en la formación de ácidos micólicos afectando la función objetivo sin que se genere muerte celular. Este comportamiento es debido probablemente a la asociación que existe entre *mez* y FAS, entre ambas enzimas se genera un canal de intercambio de NAD(P)H entre sitios activos (Wynn et al. 1999).

El modelo presenta un aumento de un 25% en los flujos de la ruta oxidativa de pentosas fosfato, de manera específica en las reacciones catalizadas por las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato, probablemente con el fin de suplir la disminución en el potencial redox.

- **Isocitrato deshidrogenasa**

La isocitrato deshidrogenasa es parte importante del metabolismo energético, a través de su activación y desactivación regula el flujo de carbono entre el ciclo de ácidos tricarboxílicos y el *Shunt* de glioxilato (Banerjee et al. 2005). La isocitrato deshidrogenasa es una enzima homodimérica que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en α -cetoglutarato liberando CO₂ y NAD(P)H en presencia de un ion metálico divalente; el

ion metálico es necesario para la actividad enzimática y la estabilidad de dímero (Hurley 1991; Ceccarelli et al. 2002; Quartararo et al. 2013; Zhao et al. 2014).

Al reducir la restricción en el flujo de carbono mediado por esta enzima se observó que la red metabólica no es sensible a cambios por encima del 20% de “*In silico* silvestre”. Como se esperaba, el flujo en el *Shunt* de glioxilato aumenta al disminuir el flujo mediado por esta enzima. De igual manera los flujos en la ruta de las pentosas fosfato y el flujo en la enzima transhidrogenasa aumentan debido a la deficiencia de NADPH ocasionado por las perturbaciones en la enzima isocitrato deshidrogenasa.

Sasseti (2003) reporta los genes *Rv3339c* y *Rv0066c*, los cuales codifican para la enzima isocitrato deshidrogenasa, como genes no esenciales para el crecimiento de *M. tuberculosis* en un medio mínimo de glucosa; sin embargo, el modelo muestra que la enzima es esencial para el crecimiento debido a que la disminución en el flujo de la enzima genera una deficiencia de glutamato provocando la muerte celular.

▪ Alfa-cetoglutarato ferredoxin oxidoreductasa

La enzima α -cetoglutarato ferredoxin oxidoreductasa se encarga de la interconversión de cetoglutarato y succinil-CoA mediante la reducción/oxidación de ferredoxin, la actividad de la enzima depende de la presencia de CoA y Mg^{2+} (Mai & Adams 1996; Yoon et al. 1996; Park et al. 2006). En varios microorganismos se ha comprobado la inhibición de la enzima por la presencia de oxígeno, en *Mycobacterium tuberculosis* (Mai & Adams 1996; Yoon et al. 1996; Park et al. 2006).

Al realizar las perturbaciones sobre el flujo mediado por esta enzima no se observó cambio alguno en la formación de biomasa y de ácidos micólicos. Sin embargo, se observó un aumento del flujo en el *Shunt* de glioxilato y en la enzima glutamato sintasa; este comportamiento concuerda con las ideas propuestas en el trabajo de Baughn (2009) en el cual, en ausencia de la enzima, el microorganismo utiliza estas rutas alternas para su crecimiento desviando el flujo de carbono a través del *Shunt* de glioxilato y haciendo uso rutas anapleróticas para reponer intermediarios del ciclo de Krebs.

▪ Succinil-CoA sintetasa

La enzima succinil-CoA sintetasa participa en el ciclo de Krebs catalizando la reacción reversible succinil CoA \rightarrow succinato; de igual forma participa en la fosforilación a nivel de sustrato de GTP; requiere de cationes divalentes, preferiblemente Mg^{2+} para su actividad (Johnson et al. 1998; Joyce et al. 2012).

Al disminuir el flujo mediado por esta enzima, el modelo presentó un perfil de flujos similar al exhibido durante la generación de perturbaciones de la enzima α -cetoglutarato ferredoxin oxidoreductasa, en el cual no se observaron cambios en la formación de biomasa y ácidos micólicos esto se debe a que ambas enzimas se encuentra en el mismos segmento en la ruta de ácidos tricarbóxicos, pero se presentó un aumento en los flujos mediados por las enzimas isocitrato liasa y glutamato sintasa.

▪ Malato sintasa

La malato sintasa es una enzima importante en el ciclo del glioxilato, ruta anaplerótica esencial para el crecimiento en acetato como única fuente de carbono. La enzima lleva a la síntesis de una molécula de malato a partir de dos moléculas de acetato, la ruta permite el remplazo de moléculas de tres carbonos como fosfoenol piruvato (PEP) y requiere de iones Mg^{2+} para la actividad catalítica (Chan & Sim 1998; Smith et al. 2003; Nakazawa et al. 2005; Anstrom & Remington 2006; Nakazawa et al. 2011; Krieger et al. 2012)

Se determinó que la capacidad de la red metabólica para mantener la formación de biomasa y ácidos micólicos no registra cambios para ningún tipo de perturbación realizada sobre la enzima. Sin embargo, se observó un aumento en los flujos de carbono mediados por las enzimas α -cetoglutarato ferredoxin oxidoreductasa y succinil-CoA sintetasa; este comportamiento en el modelo era predecible al observar los casos anteriores.

▪ Ribulosa fosfato 3 epimerasa

Ribulosa fosfato 3 epimerasa o Ribulosa 5 fosfato 3 epimerasa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, es vital para organismos fotosintéticos (Chen et al. 1998). La enzima usa preferiblemente iones de Zn^{2+} para catalizar de manera reversible la conversión de ribulosa 5 fosfato a xilulosa 5 fosfato, esta conversión es importante en la asimilación de CO_2 en plantas y el metabolismo de carbohidratos, además se encuentra ligada a la respuesta celular al estrés oxidativo (Davis et al. 1972; Jelakovic et al. 2003; Akana et al. 2006; Liang et al. 2011).

El modelo no presentó cambios en la formación de biomasa y ácidos micólicos resultado de las diversas perturbaciones. Sin embargo, es de notar la disminución en la velocidad de reacción que convierte glucosa 6 fosfato a ribulosa 5 fosfato generando una deficiencia de potencial redox (NADPH). Al igual que en el caso de la enzima fructosa bifosfato aldosa, el modelo suple esta disminución aumentando el flujo en la ruta de ácidos tricarbóxicos lo que eleva la cantidad de NADH que a través de una transdeshidrogenasa se transforma en NADPH.

▪ Transcetoalasa

La transcetoalasa es una enzima clave en la rama no oxidativa de la ruta pentosas fosfato; es importante en la producción de aminoácidos, requiere tiamina pirofosfato y iones de magnesio como cofactores para catalizar la transferencia reversible de dos grupos cetol de una cetosa fosfato (como xilulosa 5 fosfato) a una aldosa fosfato (como ribosa 5 fosfato o eritrosa 5 fosfato) generando pseudoheptulosa 7 fosfato o fructosa 6 fosfato. La enzima transcetoalasa en conjunto con la enzima aldolasa crea una unión reversible entre la ruta glucolítica y la ruta pentosas fosfato (Ikeda et al. 1999; Fullam et al. 2012).

Al reducir la restricción en el flujo en la enzima se determinó que la red metabólica es altamente sensible a las perturbaciones realizadas sobre esta enzima. El modelo permite realizar de manera individual la disminución en el flujo de las reacciones en las cuales interviene la enzima; sin embargo, sólo permite la disminución del flujo de 100% a 0% de manera simultánea en ambas reacciones; en valores intermedios *CellNetAnalyzer* no encontró solución al problema de optimización.

Se observó que de forma individual las perturbaciones sobre el flujo de las reacciones no generaron cambios en los flujos de formación de biomasa y ácidos micólicos, en ambos casos el modelo distribuye el flujo de carbonos para suplir la deficiencia de metabolitos. Sassetti (2003) reporta el gen *Rv1449c*, (el cual codifica para la enzima transcetolasa), como un gen esencial para el crecimiento de *M. tuberculosis* en un medio mínimo de glucosa; de igual forma el estudio desarrollado por Fullam (2012) y el desarrollado por Kolly (2014) demuestran la importancia de la enzima transcetolasa en el crecimiento celular de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. El modelo representó de forma similar este comportamiento, así, al disminuir a 0% el flujos de ambas reacciones el modelo predice la muerte celular (flujos de formación de biomasa y formación de ácidos micólico iguales a cero).

La ausencia del gen *Rv1997* de forma indirecta influyó en las reacciones anteriormente descritas generando cambios en el comportamiento metabólico *In silico* de Mtb UT205 en comparación a la cepa de referencia. Estos cambios metabólicos, en cuatro de las trece reacciones, afectan la supervivencia de la bacteria y provocan la muerte como se observó a partir de las diferentes simulaciones.

Es de notar que la reacción Isocitrato deshidrogenasa que reportó Sassetti (2003) como una reacción no esencial en el crecimiento de la *Mycobacterium tuberculosis*, se hace necesaria en el modelo para describir la actividad del microorganismo; la disminución en el flujo de carbonos en reacciones mediadas por esta enzima conllevan a la muerte de la bacteria por deficiencia de glutamato.

En general, a partir de los resultados de simulación, la formación de ácidos micólicos no se ve afectada significativamente como resultado de las perturbaciones realizadas, exceptuando aquellas reacciones que provocan la muerte celular, esto se debe a que la función objetivo tiene ligadas la síntesis de biomasa y la formación de ácidos micólicos.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Este estudio obtiene un modelo metabólico con grado de robustez aceptable que de manera preliminar representa la actividad metabólica de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. El modelo ha sido validado y puede ser extendido para representar la actividad metabólica de un aislado clínico de la región antioqueña.

Los mapas presentes en KEGG (*The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) no siempre están actualizados y carecen de reacciones enzimáticas importantes para *Mycobacterium tuberculosis*. Se hace necesaria la búsqueda de literatura que ayude a completar los espacios (o gaps) generados al construir el mapa metabólico y que permita una mejor comprensión de las rutas o reacciones involucradas en la síntesis del metabolito de interés, su función e importancia dentro de la abstracción del mapa metabólico.

En este estudio el modelo metabólico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se extendió al aislado clínico *M. tuberculosis* UT205, la dificultad en el proceso de acoplamiento entre los mapas metabólicos de las dos cepas radica en la identificación confiable de las reacciones o rutas involucradas en la síntesis de ácido micólico propias de la cepa UT205.

El comportamiento de los perfiles de flujo generados durante el análisis de robustez para cada una de las enzimas afectadas por la ausencia del gen *Rv1997* en *M. tuberculosis* UT205, concuerdan en su mayoría con los resultados presentados por varios autores, ya citados. Los resultados encontrados en este trabajo permiten tener un primer acercamiento al conocimiento de las características metabólicas de la cepa UT205; concretamente el comportamiento de las reacciones afectadas por la ausencia del gen

Rv1997 y que diferencian a la cepa UT205 de la cepa de referencia. Sin embargo, es necesario enriquecer el modelo con mayor información sobre genes, enzimas y variaciones en rutas metabólicas presentes en la cepa UT205, de manera que se obtenga un modelo más representativo del comportamiento real del aislado clínico.

Al comparar los perfiles de flujos metabólicos entre las cepas se determina que UT205 es incapaz de crecer con las deleciones del gen *Rv1997*, sin embargo la cepa presenta un crecimiento normal en laboratorio. Lo anterior sugiere que el aislado clínico UT205 compensa de alguna forma la disminución de cationes divalentes generada por la ausencia de la enzima codificada por el gen.

In vivo, la bacteria al ser fagocitada por el macrófago humano, es sometida a niveles bajos o casi nulos de oxígeno; sin embargo, la disminución en la cantidad de oxígeno disponible para la bacteria, no presenta limitación en el crecimiento celular. *In silico*, la simulación de eventos de baja concentración de oxígeno o la ausencia del mismo, generan la muerte celular (la formación de biomasa y ácidos micólicos se hace cero). El comportamiento observado sugiere que hay otras reacciones que no fueron consideradas como parte de las rutas seleccionadas en el modelo y que favorecen la supervivencia de la bacteria en ausencia de oxígeno.

Finalmente, el modelo desarrollado presenta una gran flexibilidad determinada por los análisis de robustez y variabilidad de flujos; la exposición del modelo a perturbaciones que representan diversos escenarios metabólicos dio lugar a una condición muy estable (del modelo), sin errores o inconsistencias. A partir del modelo, es posible simular diversos fenotipos metabólicos cuyo análisis puede eventualmente contribuir a un mejor entendimiento del sistema celular.

4.2 Recomendaciones

Se observa la necesidad de que el modelo tenga una mayor representatividad de la actividad metabólica de la bacteria; lo anterior lleva a considerar el desarrollo de un modelo a escala genómica del aislado clínico *M. tuberculosis* UT205. De igual forma se hace necesario llevar a cabo ensayos de crecimiento sobre el aislado clínico UT205 con

el fin de generar datos que sirvan como restricciones de tipo experimental para la validación del modelo a generar; esto permitirá obtener un modelo más representativo del comportamiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* UT205.

A. Anexo: Modelo de reacciones metabólicas *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabla A1: Modelo de reacciones metabólicas prevista para el modelo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Reacción	Estequiometría
GLYC::DHAP:	ATP + GLYC ==> DHAP + NADH
GLC::G6P:	GLC + ATP ==> G6P
G6P::F6P:	G6P <==> F6P
F6P::F16P:	F6P + ATP ==> F16P
F16P::F6P:	F16P ==> F6P
F16P::G3P:	F16P <==> G3P + DHAP
DHAP::G3P:	DHAP <==> G3P
G3P::3GP:	G3P <==> NADH + ATP + 3PG
3PG::PEP:	3PG <==> PEP
PEP::PYR:	PEP ==> PYR
PYR::ACCOA:	PYR ==> ACCOA + NADH + CO2
OXA::ICIT:	ACCOA + OXA ==> ICIT
ICIT::AKG:	ICIT ==> AKG + NADPH + CO2
AKG::SUCCOA:	AKG ==> CO2 + SUCCOA
SUCCOA::SUCC:	SUCCOA <==> SUCC + ATP
SUCC::FUM:	SUCC ==> FUM
FUM::MAL:	FUM ==> MAL
MAL::OXA:	MAL <==> OXA
ICIT::GLX:	ICIT ==> SUCC + GLX
GLX::MAL:	ACCOA + GLX ==> MAL
MAL::PYR:	MAL <==> PYR + NADH + CO2
OXA::PEP:	OXA <==> PEP + CO2
PYR::OXA:	PYR + ATP + CO2 ==> OXA
AKG::GLU:	AKG + NADPH + N <==> GLU
GLU::SUCC:	AKG + GLU ==> SUCC + NADH + CO2
G6P::RL5P:	G6P ==> RL5P + 2 NADPH + CO2
RL5P::R5P:	RL5P <==> R5P
RL5P::X5P:	RL5P <==> X5P

R5P::G3P:	$R5P + X5P \rightleftharpoons G3P + S7P$
E4P::G3P:	$X5P + E4P \rightleftharpoons F6P + G3P$
S7P::E4P:	$G3P + S7P \rightleftharpoons F6P + E4P$
ACCOA::MALCOA:	$ACCOA + 2 ATP + CO_2 \implies MALCOA$
ACCOA::C16-acyl-ACP-FAS:	$ACCOA + 7 NADH + 7 NADPH + 7 MALCOA \implies 7 CO_2 + C16-acyl-ACP-FAS$
ACCOA::C24-acyl-ACP-FAS:	$ACCOA + 12 NADH + 12 NADPH + 12 MALCOA \implies 12 CO_2 + C24-acyl-ACP-FAS$
C24-acyl::2-Carboxyl-C24-acyl:	$CO_2 + C24-acyl-ACP-FAS \implies 2-Carboxyl-C24-acyl$
MALCOA::MAL-ACP:	$MALCOA \implies MAL-ACP$
C16-acyl::C52-acyl:	$18 NADH + 18 NADPH + C16-acyl-ACP-FAS + 18 MAL-ACP + O_2 \implies 18 CO_2 + C52-acyl-ACP$
C16-acyl-ACP-FAS::C54-acyl-ACP:	$20 NADH + 20 NADPH + C16-acyl-ACP-FAS + 20 MAL-ACP + O_2 \implies 20 CO_2 + C54-acyl-ACP$
C16-acyl-ACP-FAS::C58-acyl-ACP:	$22 NADH + 22 NADPH + C16-acyl-ACP-FAS + 22 MAL-ACP + O_2 \implies 22 CO_2 + C58-acyl-ACP$
C52::ALMY:	$ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C52-acyl-ACP \implies NADPH + ALMY$
C54::CMETMY:	$ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C54-acyl-ACP \implies NADPH + CMETMY$
C54::TRMETMY:	$ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C54-acyl-ACP \implies NADPH + TRMETMY$
C58::CKEMY:	$ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C58-acyl-ACP \implies 2 NADPH + CKEMY$
C58::TRKEMY:	$ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C58-acyl-ACP \implies 2 NADPH + TRKEMY$
NADH::ATP:	$NADH + 0.5 O_2 \implies ATP$
NADH::NADPH:	$NADH \rightleftharpoons NADPH$
FATTY-PAR::ACCOA:	$ATP + FATTY-PAR \implies 8 ACCOA + 7 NADH$
FATTY-IMPA::PROCOA:	$ATP + FATTY-IMPA \implies 8 ACCOA + 8 NADH + PROCOA$
PROCOA::SUCCOA:	$ATP + PROCOA + CO_2 \implies SUCCOA$
PROCOA::SUCC:	$OXA + PROCOA \implies PYR + SUCC$
VAL_degra:	$AKG + VAL \implies 3 NADH + GLU + PROCOA + 2 CO_2$
ILE_degra:	$AKG + ILE \implies ACCOA + 2 NADH + GLU + PROCOA + CO_2$
E4P::CHOR:	$2 PEP + E4P + NADPH + ATP \implies CHOR$
ATP::MTHF:	$NADPH + ATP \rightleftharpoons MTHF$
R5P::PRPP:	$R5P + 2 ATP \implies PRPP$
GLU::ALA:	$PYR + GLU \implies AKG + ALA$
PYR::VAL:	$2 PYR + NADPH + GLU \implies AKG + CO_2 + VAL$
PYR::LEU:	$2 PYR + ACCOA + NADPH + ATP + GLU \implies AKG + NADH + 2 CO_2 + LEU$
OXA::ASP:	$OXA + GLU \implies AKG + ASP$
ASP::ASN:	$2 ATP + ASP + N \implies ASN$
ASP::LYS:	$PYR + 2 NADH + ATP + GLU + ASP + SUCCOA \implies AKG + SUCC + CO_2 + LYS$
3PG::SER:	$GLU + 3PG \implies AKG + NADH + SER$
SER::CYS:	$ACCOA + SER \implies CYS$

CYS::MET:	2 NADPH + ATP + GLU + MTHF + CYS + SUCCOA ==> PYR + SUCC + MET + N
ASP::THR:	2 NADPH + 2 ATP + ASP ==> THR
THR::ILE:	PYR + NADPH + GLU + THR ==> AKG + CO2 + ILE + N
GLU::GLN:	ATP + GLU + N ==> GLN
GLN::HIS:	ATP + PRPP + GLN ==> AKG + 2 NADH + HIS
GLU::PRO:	2 NADPH + ATP + GLU ==> PRO
ASP::ARG:	ACCOA + NADPH + 4 ATP + 2 GLU + CO2 + ASP + N ==> AKG + ARG + FUM
CHOR::TRP:	CHOR + PRPP + GLN + SER ==> G3P + PYR + GLU + CO2 + TRP
CHOR::TYR:	GLU + CHOR ==> AKG + NADH + CO2 + TYR
CHOR::PHE:	GLU + CHOR ==> AKG + CO2 + PHE
SER::GLY:	SER ==> MTHF + GLY
GLY::GLX:	GLY ==> GLX
<hr/>	
rATP_SYNTH:	5 ATP + CO2 + PRPP + 2 GLN + 2 MTHF + GLY ==> NADPH + 2 GLU + rATP + 2 FUM
rGTP_SYNTH:	5 ATP + CO2 + PRPP + 3 GLN + 2 MTHF + ASP + GLY ==> NADH + NADPH + 3 GLU + rGTP + 2 FUM
rUTP_SYNTH:	4 ATP + PRPP + ASP + N ==> NADH + rUTP
rCTP_SYNTH:	ATP + GLN + rUTP ==> GLU + rCTP
dATP_SYNTH:	NADPH + rATP ==> dATP
dGTP_SYNTH:	NADPH + rGTP ==> dGTP
dCTP_SYNTH:	NADPH + rCTP ==> dCTP
dTTP_SYNTH:	2 NADPH + MTHF + rUTP ==> dTTP
<hr/>	
BIOMASS:	47 ATP + 0.4926 ALMY + 0.2334 CMETMY + 0.0327 TRMETMY + 0.2117 CKEMY + 0.0297 TRKEMY + 0.214 PROTEIN + 0.036 RNA + 0.022 DNA + 0.05 SM_MOL ==> BIOMASS
PROTEIN_COMPLE:	0.429 GLU + 0.132 TRP + 0.283 GLN + 1.324 ALA + 0.832 VAL + 0.899 LEU + 0.213 ASN + 0.537 ASP + 0.696 ARG + 0.094 CYS + 0.208 HIS + 0.389 ILE + 0.192 LYS + 0.173 MET + 0.26 PHE + 0.541 SER + 0.56 PRO + 0.556 THR + 0.187 TYR + 0.958 GLY ==> PROTEIN
SM_MOL_COMPLEX:	0.188 NADH + 0.168 NADPH ==> SM_MOL
DNA_COMPLEX:	4.44 ATP + 0.557 dATP + 1.061 dGTP + 1.061 dCTP + 0.557 dTTP ==> DNA
RNA_COMPLEX:	1.98 rATP + 1.13 rGTP + 0.641 rUTP + 0.708 rCTP ==> RNA
<hr/>	
SM_MOL_EX:	SM_MOL ==>
GLC_UP:	==> GLC
BIOMASS_EX:	BIOMASS ==>
CO2_EX:	CO2 ==>
FATTY_UP:	==> FATTY-IMPA
FATTY-PAR_UP:	==> FATTY-PAR
PROTEIN_EX:	PROTEIN ==>
NH4_UP:	==> N
GLYC_UP:	==> GLYC

O2_UP: ==> O2
DNA_EX: DNA ==>
RNA_EX: RNA ==>

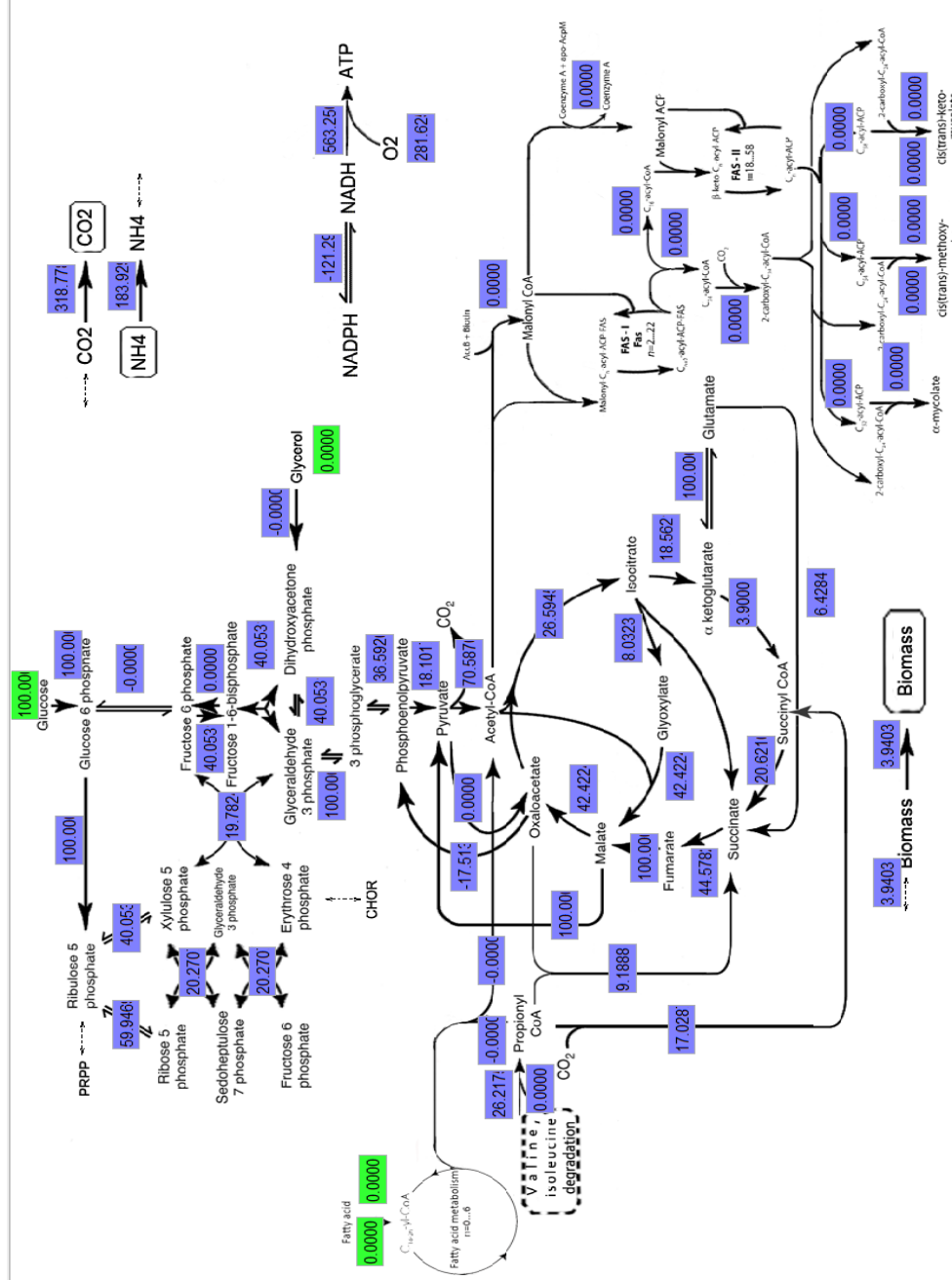


Figura B2: Evento extremo optimizando la formación de biomasa. Los valores de los flujos fueron normalizados a la tasa de consumo de glucosa y se le otorgó arbitrariamente el valor de 100 mmol α-DW⁻¹h⁻¹.

C. Anexo: Análisis de robustez

Tabla C2: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Fructosa bifosfato aldosa

Reacciones	100%	80%	60%	40%	20%	0%
G6P::F6P:	-0.021	-0.2082	-0.1545	-0.0049	0	0
F6P::F16P:	0	0.0093	0.002	0	0.0317	0.423
F16P::F6P:	0.0089	0.0805	0.0554	0.0036	0.0335	0.423
F16P::G3P:	-0.0089	-0.0712	-0.0534	-0.0036	-0.0018	0
DHAP::G3P:	0.3911	0.3288	0.3466	0.3964	0.3982	0.4
3PG::PEP:	0.3735	0.3217	0.3391	0.3764	0.3706	0.2733
PEP::PYR:	0	0.0107	0.0023	0	0.0158	0.197
PYR::ACCOA:	0.3511	0.2874	0.3197	0.3664	0.3452	0.1709
OXA::ICIT:	0.0159	0.0034	0.0036	0.022	0.031	0.1585
ICIT::AKG:	0.014	0.0034	0.0036	0.0135	0.0196	0.0816
AKG::SUCCOA:	0.0104	0	0	0.0099	0.0132	0.0592
SUCC::FUM:	0.0303	0.0191	0.0035	0.0332	0.0673	0.4422
MAL::OXA:	-52.449	-54.0226	-54.0336	-54.3415	-54.1728	-53.5699
BIOMASS:	0.0079	0.0074	0.0078	0.0079	0.0073	0
MAL::PYR:	52.4947	54.0451	54.0406	54.3992	54.2754	54.2157
OXA::PEP:	-0.3716	-0.3092	-0.335	-0.3744	-0.353	-0.0764
PYR::OXA:	52.0989	53.747	53.7123	53.9946	53.8818	53.929
G6P::RL5P:	0.021	0.2082	0.1545	0.0049	0	0
RL5P::R5P:	0.0089	0.0712	0.0534	0.0036	0.0018	0
RL5P::X5P:	0.0121	0.137	0.1011	0.0013	-0.0018	0
R5P::G3P:	0.0065	0.0689	0.051	0.0012	-0.0004	0
E4P::G3P:	0.0055	0.068	0.0501	0.0002	-0.0013	0
S7P::E4P:	0.0065	0.0689	0.051	0.0012	-0.0004	0
NADH::NADPH:	0.2896	-0.0227	0.0277	0.3191	0.3926	1.1149
ICIT::GLX:	0.0019	0	0	0.0085	0.0114	0.0769
GLX::MAL:	0.0119	0	0	0.021	0.0321	0.2036
AKG::GLU:	0.032	0.0397	0.0252	0.0345	0.0584	0.3291
GLU::SUCC:	0	0	0	0	0.0015	0.0112
PROCOA::SUCC:	0	0.0058	0.0011	0	0.01	0.0856
PROCOA::SUCCOA:	0.0181	0.0133	0.0024	0.0148	0.0312	0.2092
CO2_EX:	0.4531	0.5092	0.4718	0.4506	0.4927	1.0174
ACCOA::MALCOA:	0.3044	0.2854	0.3008	0.3044	0.2805	0
ACCOA::C16-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0.0074	0.0078	0.0079	0.0073	0

ACCOA::C24-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0.0074	0.0078	0.0079	0.0073	0
C24-acyl::2-Carboxyl-C24-acyl:	0.0079	0.0074	0.0078	0.0079	0.0073	0
MALCOA::MAL-ACP:	0.1542	0.1445	0.1524	0.1542	0.1421	0
C16-acyl::C52-acyl:	0.0039	0.0037	0.0038	0.0039	0.0036	0
C16-acyl-ACP-FAS::C54-acyl-ACP:	0.0021	0.002	0.0021	0.0021	0.0019	0
C16-acyl-ACP-FAS::C58-acyl-ACP:	0.0019	0.0018	0.0019	0.0019	0.0018	0
C52::ALMY:	0.0039	0.0037	0.0038	0.0039	0.0036	0
C54::CMETMY:	0.0018	0.0017	0.0018	0.0018	0.0017	0
C54::TRMETMY:	0.0003	0.0002	0.0003	0.0003	0.0002	0
C58::CKEMY:	0.0017	0.0016	0.0017	0.0017	0.0015	0
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0
G3P::3GP:	0.3879	0.3258	0.3435	0.3933	0.3953	0.4
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0127	0.0018	0.0241	0.0438	0.2685
FUM::MAL:	0.0338	0.0224	0.007	0.0367	0.0705	0.4422
NH4_UP:	0.0375	0.0258	0.0272	0.04	0.0475	0.1379
NADH::ATP:	53.1114	54.8256	54.7865	54.9997	54.857	54.5485
O2_UP:	26.5636	27.4202	27.4011	27.5077	27.4358	27.2742
VAL_degra:	0.0181	0	0	0.0148	0.0252	0.1036
ILE_degra:	0	0.0191	0.0035	0	0.016	0.1912
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Tabla C3: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Enolasa

Reacciones	100%	80%	60%	40%	20%	0%
G6P::F6P:	-0.021	-0.0672	-0.0809	-0.0941	-0.1171	-0.1247
F6P::F16P:	0	0	0	0	0	0
F16P::F6P:	0.0089	0.0325	0.0509	0.0691	0.0906	0.1069
F16P::G3P:	-0.0089	-0.0325	-0.0509	-0.0691	-0.0906	-0.1069
DHAP::G3P:	0.3911	0.3675	0.3491	0.3309	0.3094	0.2931
3PG::PEP:	0.3735	0.2988	0.2241	0.1494	0.0747	0
PEP::PYR:	0	0	0	0	0	0
PYR::ACCOA:	0.3511	0.3353	0.3027	0.2702	0.2345	0.2039
OXA::ICIT:	0.0159	0.0033	0.0027	0.0021	0.0015	0.0009
ICIT::AKG:	0.014	0.0033	0.0027	0.0021	0.0015	0.0009
AKG::SUCCOA:	0.0104	0	0	0	0	0
SUCC::FUM:	0.0303	0	0	0	0	0
MAL::OXA:	-52.449	-51.8182	-51.6204	-51.888	-51.7862	-51.6975
BIOMASS:	0.0079	0.0071	0.0058	0.0045	0.0032	0.0019
MAL::PYR:	52.4947	51.8795	51.7322	52.0506	51.9962	51.9602
OXA::PEP:	-0.3716	-0.297	-0.2227	-0.1483	-0.0739	0.0005
PYR::OXA:	52.0989	51.5365	51.4232	51.7755	51.7583	51.7542
G6P::RL5P:	0.021	0.0672	0.0809	0.0941	0.1171	0.1247
RL5P::R5P:	0.0089	0.0325	0.0509	0.0691	0.0906	0.1069
RL5P::X5P:	0.0121	0.0346	0.03	0.025	0.0266	0.0178
R5P::G3P:	0.0065	0.0178	0.0153	0.0128	0.0135	0.009
E4P::G3P:	0.0055	0.0169	0.0146	0.0122	0.0131	0.0088
S7P::E4P:	0.0065	0.0178	0.0153	0.0128	0.0135	0.009
NADH::NADPH:	0.2896	0.1734	0.1188	0.0652	-0.0081	-0.0503
ICIT::GLX:	0.0019	0	0	0	0	0
GLX::MAL:	0.0119	0.0405	0.0621	0.0839	0.1024	0.1261
AKG::GLU:	0.032	0.0761	0.1206	0.1653	0.2067	0.2533
GLU::SUCC:	0	0	0	0	0	0
PROCOA::SUCC:	0	0	0	0	0	0
PROCOA::SUCCOA:	0.0181	0	0	0	0	0
CO2_EX:	0.4531	0.4394	0.4461	0.4527	0.4625	0.4671
ACCOA::MALCOA:	0.3044	0.2744	0.2239	0.1734	0.1229	0.0724
ACCOA::C16-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0.0071	0.0058	0.0045	0.0032	0.0019
ACCOA::C24-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0.0071	0.0058	0.0045	0.0032	0.0019
C24-acyl::2-Carboxyl-C24-acyl:	0.0079	0.0071	0.0058	0.0045	0.0032	0.0019
MALCOA::MAL-ACP:	0.1542	0.139	0.1134	0.0878	0.0623	0.0367
C16-acyl::C52-acyl:	0.0039	0.0035	0.0029	0.0022	0.0016	0.0009
C16-acyl-ACP-FAS::C54-acyl-ACP:	0.0021	0.0019	0.0015	0.0012	0.0008	0.0005
C16-acyl-ACP-FAS::C58-acyl-ACP:	0.0019	0.0017	0.0014	0.0011	0.0008	0.0005
C52::ALMY:	0.0039	0.0035	0.0029	0.0022	0.0016	0.0009
C54::CMETMY:	0.0018	0.0017	0.0014	0.0011	0.0007	0.0004
C54::TRMETMY:	0.0003	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001

Tabla C4: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Fosfoenol piruvato carboxiquinasa

Reacciones	100%	80%	60%	40%	20%	0%
G6P::F6P:	-0.021	-0.059	-0.0566	-0.0563	-0.0676	-0.076
F6P::F16P:	0	0	0	0	0	0
F16P::F6P:	0.0089	0.0216	0.0207	0.0206	0.0243	0.027
F16P::G3P:	-0.0089	-0.0216	-0.0207	-0.0206	-0.0243	-0.027
DHAP::G3P:	0.3911	0.3784	0.3793	0.3794	0.3757	0.373
3PG::PEP:	0.3735	0.3377	0.3284	0.3191	0.3098	0.3005
PEP::PYR:	0	0.0385	0.1035	0.1687	0.2337	0.2988
PYR::ACCOA:	0.3511	0.3551	0.3566	0.3574	0.3543	0.3522
OXA::ICIT:	0.0159	0.0036	0.0035	0.0034	0.0033	0.0032
ICIT::AKG:	0.014	0.0036	0.0035	0.0034	0.0033	0.0032
AKG::SUCCOA:	0.0104	0	0	0	0	0
SUCC::FUM:	0.0303	0	0	0	0	0
MAL::OXA:	-52.449	-48.4835	-46.3881	-47.6324	-47.9609	-47.0179
BIOMASS:	0.0079	0.0078	0.0076	0.0074	0.0071	0.0069
MAL::PYR:	52.4947	48.5202	46.4351	47.689	48.0232	47.0869
OXA::PEP:	-0.3716	-0.2973	-0.223	-0.1486	-0.0743	0
PYR::OXA:	52.0989	48.1952	46.1738	47.4923	47.8949	47.0259
G6P::RL5P:	0.021	0.059	0.0566	0.0563	0.0676	0.076
RL5P::R5P:	0.0089	0.0216	0.0207	0.0206	0.0243	0.027
RL5P::X5P:	0.0121	0.0375	0.0359	0.0357	0.0433	0.0489
R5P::G3P:	0.0065	0.0192	0.0184	0.0183	0.0221	0.0249
E4P::G3P:	0.0055	0.0182	0.0175	0.0174	0.0212	0.024
S7P::E4P:	0.0065	0.0192	0.0184	0.0183	0.0221	0.0249
NADH::NADPH:	0.2896	0.2006	0.1968	0.1886	0.1572	0.1317
ICIT::GLX:	0.0019	0	0	0	0	0
GLX::MAL:	0.0119	0.0333	0.0437	0.0534	0.0591	0.0659
AKG::GLU:	0.032	0.0549	0.0647	0.0738	0.079	0.0852
GLU::SUCC:	0	0	0	0	0	0
PROCOA::SUCC:	0	0	0	0	0	0
PROCOA::SUCCOA:	0.0181	0	0	0	0	0
CO2_EX:	0.4531	0.4416	0.4512	0.4616	0.4757	0.4889
ACCOA::MALCOA:	0.3044	0.2996	0.2913	0.283	0.2748	0.2665
ACCOA::C16-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0.0078	0.0076	0.0074	0.0071	0.0069
ACCOA::C24-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0.0078	0.0076	0.0074	0.0071	0.0069
C24-acyl::2-Carboxyl-C24-acyl:	0.0079	0.0078	0.0076	0.0074	0.0071	0.0069
MALCOA::MAL-ACP:	0.1542	0.1517	0.1475	0.1433	0.1392	0.135
C16-acyl::C52-acyl:	0.0039	0.0038	0.0037	0.0036	0.0035	0.0034
C16-acyl-ACP-FAS::C54-acyl-ACP:	0.0021	0.0021	0.002	0.002	0.0019	0.0018
C16-acyl-ACP-FAS::C58-acyl-ACP:	0.0019	0.0019	0.0018	0.0018	0.0017	0.0017
C52::ALMY:	0.0039	0.0038	0.0037	0.0036	0.0035	0.0034
C54::CMETMY:	0.0018	0.0018	0.0018	0.0017	0.0017	0.0016

C54::TRMETMY:	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
C58::CKEMY:	0.0017	0.0016	0.0016	0.0016	0.0015	0.0015
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
G3P::3GP:	0.3879	0.3753	0.3763	0.3765	0.3729	0.3702
SUCCOA::SUCC:	0.0278	-0.0006	-0.0006	-0.0006	-0.0006	-0.0005
FUM::MAL:	0.0338	0.0035	0.0034	0.0033	0.0032	0.0031
NH4_UP:	0.0375	0.0604	0.07	0.0789	0.084	0.09
NADH::ATP:	53.1114	49.191	47.1306	48.4115	48.7842	47.8835
O2_UP:	26.5636	24.6033	23.5729	24.2131	24.3992	23.9487
VAL_degra:	0.0181	0	0	0	0	0
ILE_degra:	0	0	0	0	0	0
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

C52::ALMY:	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0034
C54::CMETMY:	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0016
C54::TRMETMY:	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002
C58::CKEMY:	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0015
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
G3P::3GP:	0.3879	0.3883	0.3885	0.3876	0.3874	0.3049
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0285	0.0281	0.0279	0.0301	-0.0005
FUM::MAL:	0.0338	0.0331	0.0331	0.0351	0.035	0.0031
NH4_UP:	0.0375	0.0386	0.0388	0.036	0.0358	0.0241
NADH::ATP:	53.1114	42.6114	32.1119	21.6154	11.1173	0.9906
O2_UP:	26.5636	21.3136	16.0639	10.8156	5.5665	0.5022
VAL_degra:	0.0181	0.0184	0.019	0.0198	0.0213	0
ILE_degra:	0	0	0	0	0	0
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Tabla C6: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Isocitrato deshidrogenasa

Reacciones	100%	80%	60%	40%	20%	0%
G6P::F6P:	-0.021	-0.0194	-0.0238	-0.0226	-0.039	-0.0914
F6P::F16P:	0	0	0	0	0.019	0.1437
F16P::F6P:	0.0089	0.0084	0.0099	0.0094	0.0402	0.2116
F16P::G3P:	-0.0089	-0.0084	-0.0099	-0.0094	-0.0212	-0.0679
DHAP::G3P:	0.3911	0.3916	0.3901	0.3906	0.3788	0.3321
3PG::PEP:	0.3735	0.3727	0.3724	0.372	0.3371	0.1832
PEP::PYR:	0	0	0	0	0.029	0.1213
PYR::ACCOA:	0.3511	0.3573	0.3494	0.3605	0.3112	0.1972
OXA::ICIT:	0.0159	0.0169	0.0121	0.0159	0.0373	0.1221
ICIT::AKG:	0.014	0.0112	0.0084	0.0056	0.0028	0
AKG::SUCCOA:	0.0104	0.0076	0.0048	0.002	0	0
SUCC::FUM:	0.0303	0.0295	0.0292	0.0288	0.1068	0.3145
MAL::OXA:	-52.449	-48.7579	-47.5159	-48.4688	-46.7957	-46.9088
BIOMASS:	0.0079	0.0079	0.0079	0.0079	0.0061	0
MAL::PYR:	52.4947	48.808	47.5626	48.5224	46.9713	47.4704
OXA::PEP:	-0.3716	-0.3707	-0.3704	-0.3701	-0.3065	-0.0619
PYR::OXA:	52.0989	48.4096	47.1632	48.1202	46.59	47.1811
G6P::RL5P:	0.021	0.0194	0.0238	0.0226	0.039	0.0914
RL5P::R5P:	0.0089	0.0084	0.0099	0.0094	0.0212	0.0679
RL5P::X5P:	0.0121	0.011	0.0139	0.0131	0.0178	0.0235
R5P::G3P:	0.0065	0.006	0.0074	0.007	0.0093	0.0118
E4P::G3P:	0.0055	0.005	0.0065	0.0061	0.0085	0.0118
S7P::E4P:	0.0065	0.006	0.0074	0.007	0.0093	0.0118
NADH::NADPH:	0.2896	0.2939	0.2923	0.2934	0.4077	0.6055
ICIT::GLX:	0.0019	0.0057	0.0037	0.0103	0.0345	0.1221
GLX::MAL:	0.0119	0.017	0.0139	0.0212	0.0544	0.1826
AKG::GLU:	0.032	0.0334	0.0322	0.033	0.0805	0.2408
GLU::SUCC:	0	0	0	0	0	0
PROCOA::SUCC:	0	0	0	0	0.0215	0.0641
PROCOA::SUCCOA:	0.0181	0.0163	0.0207	0.0166	0.0508	0.1283
CO2_EX:	0.4531	0.4517	0.4529	0.4521	0.5544	0.8254
ACCOA::MALCOA:	0.3044	0.3044	0.3044	0.3044	0.2353	0
ACCOA::C16-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0.0079	0.0079	0.0079	0.0061	0
ACCOA::C24-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0.0079	0.0079	0.0079	0.0061	0
C24-acyl::2-Carboxyl-C24-acyl:	0.0079	0.0079	0.0079	0.0079	0.0061	0
MALCOA::MAL-ACP:	0.1542	0.1542	0.1542	0.1542	0.1192	0
C16-acyl::C52-acyl:	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.003	0
C16-acyl-ACP-FAS::C54-acyl-ACP:	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0016	0
C16-acyl-ACP-FAS::C58-acyl-ACP:	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0015	0
C52::ALMY:	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.003	0
C54::CMETMY:	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0014	0

C54::TRMETMY:	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0002	0
C58::CKEMY:	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0013	0
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0
G3P::3GP:	0.3879	0.3885	0.387	0.3874	0.3662	0.276
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0232	0.0248	0.0179	0.0503	0.1283
FUM::MAL:	0.0338	0.033	0.0327	0.0323	0.1212	0.379
NH4_UP:	0.0375	0.0389	0.0377	0.0385	0.0759	0.2535
NADH::ATP:	53.1114	49.4229	48.182	49.1406	47.5743	48.1691
O2_UP:	26.5636	24.7194	24.0989	24.5782	23.7932	24.0845
VAL_degra:	0.0181	0.0163	0.0207	0.0166	0.0418	0.0851
ILE_degra:	0	0	0	0	0.0305	0.1074
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

C54::TRMETMY:	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
C58::CKEMY:	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
G3P::3GP:	0.3879	0.3884	0.388	0.3878	0.3876	0.3875
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0293	0.0282	0.0272	0.026	0.0239
FUM::MAL:	0.0338	0.0347	0.0336	0.0326	0.0317	0.0313
NH4_UP:	0.0375	0.0371	0.0379	0.0386	0.0393	0.0397
NADH::ATP:	53.1114	48.886	48.8869	48.887	48.8868	49.1446
O2_UP:	26.5636	24.4509	24.4514	24.4514	24.4513	24.5802
VAL_degra:	0.0181	0.0188	0.0205	0.0222	0.0238	0.0245
ILE_degra:	0	0	0	0	0	0
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

C54::TRMETMY:	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
C58::CKEMY:	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
G3P::3GP:	0.3879	0.3876	0.3868	0.3863	0.3861	0.3857
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0222	0.0167	0.0111	0.0056	0
FUM::MAL:	0.0338	0.0303	0.0275	0.026	0.0255	0.0306
NH4_UP:	0.0375	0.0407	0.0427	0.0438	0.044	0.0386
NADH::ATP:	53.1114	49.0968	49.1234	49.12	48.922	47.59
O2_UP:	26.5636	24.5563	24.5696	24.5679	24.4689	23.8029
VAL_degra:	0.0181	0.0148	0.012	0.0085	0.0049	0.0005
ILE_degra:	0	0	0	0	0	0
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

C58::CKEMY:	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
G3P::3GP:	0.3879	0.3875	0.3873	0.387	0.3872	0.3847
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0298	0.0319	0.0341	0.0366	0.0365
FUM::MAL:	0.0338	0.0382	0.039	0.0396	0.041	0.0406
NH4_UP:	0.0375	0.0328	0.0317	0.0309	0.0297	0.0275
NADH::ATP:	53.1114	51.9232	51.9127	51.9143	52.1672	52.8999
O2_UP:	26.5636	25.9695	25.9642	25.9651	26.0915	26.4579
VAL_degra:	0.0181	0.015	0.0159	0.0168	0.0156	0.016
ILE_degra:	0	0	0	0	0	0
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

C52::ALMY:	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039
C54::CMETMY:	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018
C54::TRMETMY:	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
C58::CKEMY:	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
G3P::3GP:	0.3879	0.3891	0.3903	0.3915	0.3927	0.3939
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0298	0.0312	0.0312	0.0312	0.0325
FUM::MAL:	0.0338	0.035	0.0358	0.0362	0.0375	0.0381
NH4_UP:	0.0375	0.0376	0.0379	0.0388	0.0387	0.0393
NADH::ATP:	53.1114	53.3548	53.4921	53.5147	53.4465	53.4168
O2_UP:	26.5636	26.6853	26.754	26.7653	26.7311	26.7163
VAL_degra:	0.0181	0.0202	0.0209	0.0201	0.0206	0.0211
ILE_degra:	0	0	0	0	0	0
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

C52::ALMY:	0.0039	0.0038	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039
C54::CMETMY:	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018
C54::TRMETMY:	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
C58::CKEMY:	0.0017	0.0016	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
G3P::3GP:	0.3879	0.3425	0.3554	0.3684	0.3814	0.3944
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0023	0.0052	0.0148	0.0207	0.0337
FUM::MAL:	0.0338	0.0077	0.0098	0.0191	0.0295	0.0388
NH4_UP:	0.0375	0.0271	0.029	0.0327	0.0353	0.0391
NADH::ATP:	53.1114	53.3064	53.3826	53.2828	52.9089	53.1502
O2_UP:	26.5636	26.661	26.6992	26.6493	26.4624	26.583
VAL_degra:	0.0181	0	0.0045	0.0104	0.0136	0.0222
ILE_degra:	0	0.0043	0	0	0	0
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

C52::ALMY:	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039
C54::CMETMY:	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018
C54::TRMETMY:	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
C58::CKEMY:	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017	0.0017
C58::TRKEMY:	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
G3P::3GP:	0.3879	0.389	0.3901	0.3912	0.3923	0.3934
SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.0285	0.0244	0.0304	0.0322	0.0324
FUM::MAL:	0.0338	0.0344	0.0337	0.0363	0.0373	0.0374
NH4_UP:	0.0375	0.0381	0.0399	0.0384	0.0385	0.0395
NADH::ATP:	53.1114	53.4072	53.6978	53.5799	53.5698	53.6965
O2_UP:	26.5636	26.7115	26.8568	26.7979	26.7928	26.8561
VAL_degra:	0.0181	0.0182	0.0151	0.0202	0.0215	0.0206
ILE_degra:	0	0	0	0	0	0
GLYC::DHAP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GLYC_UP:	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Tabla C13: Flujos metabólicos para perturbaciones en la enzima Transcetolasa.

Reacciones	100%	0%	Reacciones	100%	0%
G6P::F6P:	-0.021	-0.048	GLU::SUCC:	0	0.0117
F6P::F16P:	0	0.2061	PROCOA::SUCC:	0	0.0722
F16P::F6P:	0.0089	0.2542	PROCOA::SUCCOA:	0.0181	0.1258
F16P::G3P:	-0.0089	-0.048	CO2_EX:	0.4531	0.8436
DHAP::G3P:	0.3911	0.352	ACCOA::MALCOA:	0.3044	0
3PG::PEP:	0.3735	0.2062	ACCOA::C16-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0
PEP::PYR:	0	0.0982	ACCOA::C24-acyl-ACP-FAS:	0.0079	0
			C24-acyl::2-Carboxyl-C24-acyl:	0.0079	0
PYR::ACCOA:	0.3511	0.1713	MALCOA::MAL-ACP:	0.1542	0
OXA::ICIT:	0.0159	0.1565	C16-acyl::C52-acyl:	0.0039	0
ICIT::AKG:	0.014	0.0815	C16-acyl-ACP-FAS::C54-acyl-ACP:	0.0021	0
AKG::SUCCOA:	0.0104	0.0581	C16-acyl-ACP-FAS::C58-acyl-ACP:	0.0019	0
SUCC::FUM:	0.0303	0.3428	C52::ALMY:	0.0039	0
MAL::OXA:	-52.449	-50.5197	C54::CMETMY:	0.0018	0
BIOMASS:	0.0079	0	C54::TRMETMY:	0.0003	0
MAL::PYR:	52.4947	51.0667	C58::CKEMY:	0.0017	0
OXA::PEP:	-0.3716	-0.108	C58::TRKEMY:	0.0002	0
PYR::OXA:	52.0989	50.7961	G3P::3GP:	0.3879	0.3039
G6P::RL5P:	0.021	0.048	SUCCOA::SUCC:	0.0278	0.1839
RL5P::R5P:	0.0089	0.048	FUM::MAL:	0.0338	0.4059
RL5P::X5P:	0.0121	0	NH4_UP:	0.0375	0.2406
R5P::G3P:	0.0065	0	NADH::ATP:	53.1114	51.6877
E4P::G3P:	0.0055	0	O2_UP:	26.5636	25.8439
S7P::E4P:	0.0065	0	VAL_degra:	0.0181	0.0717
NADH::NADPH:	0.2896	0.6625	ILE_degra:	0	0.1263
ICIT::GLX:	0.0019	0.0749	GLYC::DHAP:	0.4	0.4
GLX::MAL:	0.0119	0.1411	GLYC_UP:	0.4	0.4
AKG::GLU:	0.032	0.2651			

D. Anexo: Abreviación metabolitos

Tabla D14: Listado de la abreviación utilizada para los metabolitos.

Abreviación	Nombre oficial	Abreviación	Nombre oficial
3GP	3 fosfo glicerato	ILE	Isoleucina
ACCOA	Acetil Coenzima	LEU	Leucina
AKG	Alfa cetoglutarato	LYS	Lisina
ALA	Alanina	MAL	Malato
ALMY	Alfa micolato	MALCOA	Malonil-CoA
ARG	Arginina	MET	Metionina
ASN	Asparagina	MTHF	5,10-Metheniltetrahidrofolato
ASP	Aspartato	NADH	NADH
ATP	Adenosin Trifosfato	NADPH	NADPH
BIOMASS:	Biomasa	NH4	NH4
CHOR	Corismato	O2	Oxigeno
CKEMY:	Cis ceto-micolato	OXA	Oxaloacetato
CMETMY	Cis metoxi-micolato	PEP	Fosfoenol piruvato
CO2	Dioxido de carbono	PHE	Fenil alanina
CYS	Cisteina	PRO	Prolina
dATP	ATP formación DNA	PROCOA	Propionil-CoA
dCTP	CTP formación DNA	PRPP	5 fosfato alfa ribosa
dGTP	GTP formación DNA	PYR	Piruvato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato	R5P	Ribosa 5 fosfato
dTTP	TTP formación DNA	rATP	ATP formación RNA
E4P	Eritrosa 4 fosfato	rCTP	CTP formación RNA
F16P	Fructosa 1-6 bifosfato	rGTP	GTP formación RNA
F6P	Fructosa 6 fosfato	RL5P	Ribulosa 5 fosfato
FATTY-IMPA	Cadenas de ácidos grasos impares	rUTP	UTP formación RNA
FATTY-PAR	Cadenas de ácidos grasos pares	S7P	Sedoheptulosa
FUM	Fumarato	SER	Serina
G3P	Gliceraldehido 3 fosfato	SUCC	Succinato
G6P	Glucosa 6 fosfato	SUCCOA	Succinil-CoA
GLC	Glucosa	THR	Treonina

Abreviación	Nombre oficial	Abreviación	Nombre oficial
GLN	Glutamina	TRKEMY:	Trans ceto-micolato
GLU	Glutamato	TRMETMY	Trans metoxi-micolato
GLX	Glioxilato	TRP	Triptofano
GLY	Glicina	TYR	Tirosina
GLYC	Glicerol	VAL	Valina
HIS	Histidina	X5P	Xilulosa 5 fosfato
ICIT	Isocitrato		

E. Anexo: Análisis de variabilidad de flujo

Tabla E15: Flujos máximos y mínimos para obtenidos mediante FVA para cada una de las reacciones del modelo metabólico

Reacción	Estequiometría	MinFlux	MaxFlux
GLYC::DHAP:	ATP + GLYC ==> DHAP + NADH	0	100
GLC::G6P:	GLC + ATP ==> G6P	0	100
G6P::F6P:	G6P <=> F6P	-100	84,7757
F6P::F16P:	F6P + ATP ==> F16P	0	100
F16P::F6P:	F16P ==> F6P	0	100
F16P::G3P:	F16P <=> G3P + DHAP	-62,7821	56,9551
DHAP::G3P:	DHAP <=> G3P	-48,0364	100
G3P::3GP:	G3P <=> NADH + ATP + 3PG	-70,0911	100
3PG::PEP:	3PG <=> PEP	-100	100
PEP::PYR:	PEP ==> PYR	0	100
PYR::ACCOA:	PYR ==> ACCOA + NADH + CO2	0	100
OXA::ICIT:	ACCOA + OXA ==> ICIT	0	100
ICIT::AKG:	ICIT ==> AKG + NADPH + CO2	0	100
AKG::SUCCOA:	AKG ==> CO2 + SUCCOA	0	99,8959
SUCCOA::SUCC:	SUCCOA <=> SUCC + ATP	-3,1441	100
SUCC::FUM:	SUCC ==> FUM	0	100
FUM::MAL:	FUM ==> MAL	9,35E-06	100
MAL::OXA:	MAL <=> OXA	-100	100
ICIT::GLX:	ICIT ==> SUCC + GLX	0	99,8997
GLX::MAL:	ACCOA + GLX ==> MAL	0	100
MAL::PYR:	MAL <=> PYR + NADH + CO2	-100	100
OXA::PEP:	OXA <=> PEP + CO2	-100	100
PYR::OXA:	PYR + ATP + CO2 ==> OXA	0	100
AKG::GLU:	AKG + NADPH + N <=> GLU	0	100
GLU::SUCC:	AKG + GLU ==> SUCC + NADH + CO2	0	50
G6P::RL5P:	G6P ==> RL5P + 2 NADPH + CO2	0	100
RL5P::R5P:	RL5P <=> R5P	1,17E-06	68,9282
RL5P::X5P:	RL5P <=> X5P	-30,7006	66,6667
R5P::G3P:	R5P + X5P <=> G3P + S7P	-15,3503	34,0196
E4P::G3P:	X5P + E4P <=> F6P + G3P	-15,3503	33,3333

S7P::E4P:	G3P + S7P <=> F6P + E4P	-15,3503	34,0196
ACCOA::MALCOA:	ACCOA + 2 ATP + CO2 ==> MALCOA	0	100
Reacción	Estequiometría	MinFlux	MaxFlux
ACCOA::C16-acyl-ACP-FAS:	ACCOA + 7 NADH + 7 NADPH + 7 MALCOA ==> 7 CO2 + C16-acyl-ACP-FAS	0	2,5976
ACCOA::C24-acyl-ACP-FAS:	ACCOA + 12 NADH + 12 NADPH + 12 MALCOA ==> 12 CO2 + C24-acyl-ACP-FAS	0	2,5976
C24-acyl::2-Carboxyl-C24-acyl:	CO2 + C24-acyl-ACP-FAS ==> 2-Carboxyl-C24-acyl	0	2,5976
MALCOA::MAL-ACP:	MALCOA ==> MAL-ACP	0	50,6463
C16-acyl::C52-acyl:	18 NADH + 18 NADPH + C16-acyl-ACP-FAS + 18 MAL-ACP + O2 ==> 18 CO2 + C52-acyl-ACP	0	1,2794
C16-acyl-ACP-FAS::C54-acyl-ACP:	20 NADH + 20 NADPH + C16-acyl-ACP-FAS + 20 MAL-ACP + O2 ==> 20 CO2 + C54-acyl-ACP	0	0,69114
C16-acyl-ACP-FAS::C58-acyl-ACP:	22 NADH + 22 NADPH + C16-acyl-ACP-FAS + 22 MAL-ACP + O2 ==> 22 CO2 + C58-acyl-ACP	0	0,62699
C52::ALMY:	ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C52-acyl-ACP ==> NADPH + ALMY	0	1,2794
C54::CMETMY:	ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C54-acyl-ACP ==> NADPH + CMETMY	0	0,60621
C54::TRMETMY:	ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C54-acyl-ACP ==> NADPH + TRMETMY	0	0,084932
C58::CKEMY:	ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C58-acyl-ACP ==> 2 NADPH + CKEMY	0	0,54985
C58::TRKEMY:	ATP + 2-Carboxyl-C24-acyl + C58-acyl-ACP ==> 2 NADPH + TRKEMY	0	4,9875
NADH::ATP:	NADH + 0.5 O2 ==> ATP	0	684.628
NADH::NADPH:	NADH <=> NADPH	-2.460.499	3.368.044
FATTY-PAR::ACCOA:	ATP + FATTY-PAR ==> 8 ACCOA + 7 NADH	0	39,3738
FATTY-IMPA::PROCOA:	ATP + FATTY-IMPA ==> 8 ACCOA + 8 NADH + PROCOA	0	36,8908
PROCOA::SUCCOA:	ATP + PROCOA + CO2 ==> SUCCOA	0	99,9173
PROCOA::SUCC:	OXA + PROCOA ==> PYR + SUCC	0	100
VAL_degra:	AKG + VAL ==> 3 NADH + GLU + PROCOA + 2 CO2	0	981.911
ILE_degra:	AKG + ILE ==> ACCOA + 2 NADH + GLU + PROCOA + CO2	0	804.671
E4P::CHOR:	2 PEP + E4P + NADPH + ATP ==> CHOR	0	4,9875
ATP::MTHF:	NADPH + ATP <=> MTHF	-97,9173	36,3595

R5P::PRPP:	R5P + 2 ATP ==> PRPP	0	53,3923
GLU::ALA:	PYR + GLU ==> AKG + ALA	0	11,4049
Reacción	Estequiometria	MinFlux	MaxFlux
PYR::VAL:	2 PYR + NADPH + GLU ==> AKG + CO2 + VAL	0	98,4028
PYR::LEU:	2 PYR + ACCOA + NADPH + ATP + GLU ==> AKG + NADH + 2 CO2 + LEU	0	7,744
OXA::ASP:	OXA + GLU ==> AKG + ASP	0	80,8738
ASP::ASN:	2 ATP + ASP + N ==> ASN	0	1,8348
ASP::LYS:	PYR + 2 NADH + ATP + GLU + ASP + SUCCOA ==> AKG + SUCC + CO2 + LYS	0	1,6539
3PG::SER:	GLU + 3PG ==> AKG + NADH + SER	0	98,3272
SER::CYS:	ACCOA + SER ==> CYS	0	2,2999
CYS::MET:	2 NADPH + ATP + GLU + MTHF + CYS + SUCCOA ==> PYR + SUCC + MET + N	0	1,4902
ASP::THR:	2 NADPH + 2 ATP + ASP ==> THR	0	80,5154
THR::ILE:	PYR + NADPH + GLU + THR ==> AKG + CO2 + ILE + N	0	80,5154
GLU::GLN:	ATP + GLU + N ==> GLN	0	96,487
GLN::HIS:	ATP + PRPP + GLN ==> AKG + 2 NADH + HIS	0	1,7917
GLU::PRO:	2 NADPH + ATP + GLU ==> PRO	0	4,8238
ASP::ARG:	ACCOA + NADPH + 4 ATP + 2 GLU + CO2 + ASP + N ==> AKG + ARG + FUM	0	5,9953
CHOR::TRP:	CHOR + PRPP + GLN + SER ==> G3P + PYR + GLU + CO2 + TRP	0	1,137
CHOR::TYR:	GLU + CHOR ==> AKG + NADH + CO2 + TYR	0	1,6108
CHOR::PHE:	GLU + CHOR ==> AKG + CO2 + PHE	0	2,2396
SER::GLY:	SER ==> MTHF + GLY	0	98,1761
GLY::GLX:	GLY ==> GLX	0	97,9112
rATP_SYNTH:	5 ATP + CO2 + PRPP + 2 GLN + 2 MTHF + GLY ==> NADPH + 2 GLU + rATP + 2 FUM	0	23,7086
rGTP_SYNTH:	5 ATP + CO2 + PRPP + 3 GLN + 2 MTHF + ASP + GLY ==> NADH + NADPH + 3 GLU + rGTP + 2 FUM	0	17,4748
rUTP_SYNTH:	4 ATP + PRPP + ASP + N ==> NADH + rUTP	0	26,6487
rCTP_SYNTH:	ATP + GLN + rUTP ==> GLU + rCTP	0	17,4748
dATP_SYNTH:	NADPH + rATP ==> dATP	0	9,1739
dGTP_SYNTH:	NADPH + rGTP ==> dGTP	0	17,4748
dCTP_SYNTH:	NADPH + rCTP ==> dCTP	0	17,4748
dTTP_SYNTH:	2 NADPH + MTHF + rUTP ==> dTTP	0	9,1739

Reacción	Estequiometria	MinFlux	MaxFlux
BIOMASS:	47 ATP + 0.4926 ALMY + 0.2334 CMETMY + 0.0327 TRMETMY + 0.2117 CKEMY + 0.0297 TRKEMY + 0.214 PROTEIN + 0.036 RNA + 0.022 DNA + 0.05 SM_MOL ==> BIOMASS	0	25,973
PROTEIN_COMPLE:	0.429 GLU + 0.132 TRP + 0.283 GLN + 1.324 ALA + 0.832 VAL + 0.899 LEU + 0.213 ASN + 0.537 ASP + 0.696 ARG + 0.094 CYS + 0.208 HIS + 0.389 ILE + 0.192 LYS + 0.173 MET + 0.26 PHE + 0.541 SER + 0.56 PRO + 0.556 THR + 0.187 TYR + 0.958 GLY ==> PROTEIN	0	8,614
SM_MOL_COMPLEX:	0.188 NADH + 0.168 NADPH ==> SM_MOL	0	100
DNA_COMPLEX:	4.44 ATP + 0.557 dATP + 1.061 dGTP + 1.061 dCTP + 0.557 dTTP ==> DNA	0	16,4701
RNA_COMPLEX:	1.98 rATP + 1.13 rGTP + 0.641 rUTP + 0.708 rCTP ==> RNA	0	11,9741
SM_MOL_EX:	SM_MOL ==>	0	100
GLC_UP:	==> GLC	0	100
BIOMASS_EX:	BIOMASS ==>	0	25,973
CO2_EX:	CO2 ==>	5,58E-06	4.418.335
FATTY-IMPA_UP:	==> FATTY-IMPA	0	36,8908
FATTY-PAR_UP:	==> FATTY-PAR	0	39,3738
PROTEIN_EX:	PROTEIN ==>	0	8,614
NH4_UP:	==> N	1,42E-05	2.148.956
GLYC_UP:	==> GLYC	0	100
O2_UP:	==> O2	0	3.449.115
DNA_EX:	DNA ==>	0	16,4701
RNA_EX:	RNA ==>	0	12

Bibliografía

- Ahmad, Z. et al., 2009. Biphasic kill curve of isoniazid reveals the presence of drug-tolerant, not drug-resistant, *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *The Journal of infectious diseases*, 200(7), pp.1136–43.
- Akana, J. et al., 2006. D-Ribulose 5-phosphate 3-epimerase: functional and structural relationships to members of the ribulose-phosphate binding (beta/alpha)8-barrel superfamily. *Biochemistry*, 45(8), pp.2493–503.
- Anstrom, D.M. & Remington, S.J., 2006. The product complex of *M. tuberculosis* malate synthase revisited. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 15(8), pp.2002–7.
- Antoniewicz, M.R., 2013. Dynamic metabolic flux analysis-tools for probing transient states of metabolic networks. *Current opinion in biotechnology*, 24(6), pp.973–8.
- Arora, G. et al., 2010. Understanding the role of PknJ in *Mycobacterium tuberculosis*: biochemical characterization and identification of novel substrate pyruvate kinase A. *PloS one*, 5(5), p.e10772.
- Asai, Y. et al., 2011. An Open Platform toward Large-Scale Multilevel Modeling and Simulation of Physiological Systems. In *Applications and the Internet (SAINT), 2011 IEEE/IPSJ 11th International Symposium on*. IEEE, pp. 250–255.
- Banerjee, S. et al., 2005. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate dehydrogenases (ICD-1 and ICD-2) reveals differences in coenzyme affinity, oligomeric state, pH tolerance and phylogenetic affiliation. *BMC biochemistry*, 6(1), p.20.
- Bartek, I.L. et al., 2009. The DosR regulon of *M. tuberculosis* and antibacterial tolerance. *Tuberculosis*, 89(4), pp.310–316.
- Baughn, A.D. et al., 2009. An anaerobic-type alpha-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase completes the oxidative tricarboxylic acid cycle of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 5(11), p.e1000662.
- Becker, S. a & Palsson, B.Ø., 2005. Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Staphylococcus aureus* N315: an initial draft to the two-dimensional annotation. *BMC microbiology*, 5, p.8.
- Vander Beken, S. et al., 2011. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *European journal of immunology*, 41(2), pp.450–60.
- Beste, D. et al., 2011. ¹³C Metabolic Flux Analysis Identifies an Unusual Route for Pyruvate Dissimilation in *Mycobacteria* which Requires Isocitrate Lyase and Carbon Dioxide Fixation. *PLoS pathogens*, 7(7).

- Beste, D.J. V et al., 2013. ^{13}C -flux spectral analysis of host-pathogen metabolism reveals a mixed diet for intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry & biology*, 20(8), pp.1012–21.
- Beste, D.J. V et al., 2007. GSMN-TB: a web-based genome-scale network model of *Mycobacterium tuberculosis* metabolism. *Genome biology*, 8(5), p.R89.
- Beste, D.J. V et al., 2009. The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria. *PloS one*, 4(4), p.e5349.
- Bhatt, A. et al., 2007. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Molecular microbiology*, 64(6), pp.1442–54.
- Boele, J., Olivier, B.G. & Teusink, B., 2012. FAME, the Flux Analysis and Modeling Environment. *BMC systems biology*, 6(1), p.8.
- Bordbar, A. et al., 2010. Insight into human alveolar macrophage and *M. tuberculosis* interactions via metabolic reconstructions. *Molecular systems biology*, 6(422), p.422.
- Borodina, I., Krabben, P. & Nielsen, J., 2005. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome research*, 15(6), pp.820–9.
- Boshoff, H., Mizrahi, V. & Barry, C., 2002. Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *Journal of bacteriology*, 184(8).
- Brennan, P.J. & Nikaido, H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, 64, pp.29–63.
- Brown, T. et al., 2010. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes. *Emerging infectious diseases*, 16(2), pp.272–80.
- Bushell, M.E. et al., 2006. The use of genome scale metabolic flux variability analysis for process feed formulation based on an investigation of the effects of the *zwf* mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), pp.1347–1353.
- Cantaloube, S. et al., 2011. The *Mycobacterium Tuberculosis* FAS-II Dehydratases and Methyltransferases Define the Specificity of the Mycolic Acid Elongation Complexes. *PloS one*, 6.
- de Carvalho, L.P.S. et al., 2010. Metabolomics of *Mycobacterium tuberculosis* reveals compartmentalized co-catabolism of carbon substrates. *Chemistry & biology*, 17(10), pp.1122–31.
- Ceccarelli, C. et al., 2002. Crystal structure of porcine mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase complexed with Mn²⁺ and isocitrate. Insights into the enzyme mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 277(45), pp.43454–62.
- Chan, M. & Sim, T.S., 1998. Malate synthase from *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585: Cloning, molecular characterization and its control by acetate. *Microbiology*, 144(11), pp.3229–3237.
- Chandra, N., Kumar, D. & Rao, K., 2011. Systems biology of tuberculosis. *Tuberculosis*, 91, pp.487–496.
- Chandrasekaran, S. & Price, N., 2010. Probabilistic integrative modeling of genome-scale

- metabolic and regulatory networks in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(41), pp.17845–17850.
- Chavadi, S. et al., 2009. Global effects of inactivation of the pyruvate kinase gene in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of bacteriology*, 191(24), pp.7545–53.
- Chen, Y.R. et al., 1998. D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase: Cloning and heterologous expression of the spinach gene, and purification and characterization of the recombinant enzyme. *Plant Physiology*, 118(1), pp.199–207.
- Christina Smolke, 2009. *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals*, CRC Press/Taylor & Francis.
- Clewley, R., 2012. Hybrid models and biological model reduction with PyDSTool. A. Prlic, ed. *PLoS computational biology*, 8(8), p.e1002628.
- Cole, S.T. et al., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), pp.537–44.
- Colijn, C. et al., 2009. Interpreting expression data with metabolic flux models: predicting *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid production. *PLoS computational biology*, 5(8), p.e1000489.
- Dannelly, H.K. & Reeves, H.C., 1988. *Purification and characterization of enolase from Escherichia coli*,
- Davis, L., Lee, N. & Glaser, L., 1972. On the mechanism of the pentose phosphate epimerases. *The Journal of biological chemistry*, 247(18), pp.5862–6.
- Dhar, P. et al., 2004. Cellware: a multi-algorithmic software for computational systems biology. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(8), pp.1319–21.
- Droste, P., Nöh, K. & Wiechert, W., 2013. Omix - A Visualization Tool for Metabolic Networks with Highest Usability and Customizability in Focus. *Chemie Ingenieur Technik*, 85(6), pp.849–862.
- Dubnau, E. et al., 2002. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Molecular Microbiology*, 36(3), pp.630–637.
- Edens, W.A., Urbauer, J.L. & Cleland, W.W., 1997. Determination of the chemical mechanism of malic enzyme by isotope effects. *Biochemistry*, 36(5), pp.1141–7.
- Fang, X., Wallqvist, A. & Reifman, J., 2009. A systems biology framework for modeling metabolic enzyme inhibition of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC systems biology*, 3, p.92.
- Fang, X., Wallqvist, A. & Reifman, J., 2010. Development and analysis of an in vivo-compatible metabolic network of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC systems biology*, 4.
- Fang, X., Wallqvist, A. & Reifman, J., 2012. Modeling phenotypic metabolic adaptations of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under hypoxia. *PLoS computational biology*, 8(9).
- Fiehn, O. et al., 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology*, 18(11), pp.1157–61.
- Francke, C., Siezen, R.J. & Teusink, B., 2005. Reconstructing the metabolic network of a

- bacterium from its genome. *Trends in Microbiology*, 13(11), pp.550–558.
- Fullam, E. et al., 2012. Structure and function of the transketolase from *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with the human enzyme. *Open biology*, 2(1), p.110026.
- Funahashi, A. et al., 2008. CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks. *Proceedings of the IEEE*, 96(8), pp.1254–1265.
- Gagneux, S. et al., 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), pp.2869–73.
- Gagneux, S. & Small, P.M., 2007. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *The Lancet infectious diseases*, 7(5), pp.328–37.
- Galagan, J. et al., 2013. The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature*, 499(7457), pp.178–183.
- García Ramos, R. et al., 2003. Tratamiento actual de la tuberculosis. *Anales de Medicina Interna*, 20(2), pp.43–52.
- Ghosh, S. et al., 2011. Software for systems biology: from tools to integrated platforms. *Nature reviews. Genetics*, 12(12), pp.821–832.
- Gillespie, J.J. et al., 2011. PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infection and immunity*, 79(11), pp.4286–98.
- Gombert, a K. & Nielsen, J., 2000. Mathematical modelling of metabolism. *Current opinion in biotechnology*, 11(2), pp.180–6.
- Gorocica, P. et al., 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(2), pp.142–153.
- Gould, T. a et al., 2006. Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 61(4), pp.940–7.
- Griffin, J.E. et al., 2011. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS pathogens*, 7(9), p.e1002251.
- Gudmundsson, S. & Thiele, I., 2010. Computationally efficient flux variability analysis. *BMC bioinformatics*, 11(1), p.489.
- Hädicke, O. & Klamt, S., 2010. CASOP: A Computational Approach for Strain Optimization aiming at high Productivity. *Journal of Biotechnology*, 147(2), pp.88–101.
- Han, K. et al., 2012. Molecular cloning, expression and characterization of enolase from adult *Haemonchus contortus*. *Research in veterinary science*, 92(2), pp.259–65.
- Höner Zu Bentrup, K. et al., 1999. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 181(23), pp.7161–7.
- Hoops, S. et al., 2006. COPASI: a COmplex Pathway Simulator. *Bioinformatics (Oxford*,

- England), 22(24), pp.3067–74.
- Hsu, R., 1982. Pigeon liver malic enzyme. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 43(1), pp.3–26.
- Hurley, J.H., 1991. Catalytic mechanism of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: implications from the structures of magnesium-isocitrate and NADP⁺ complexes. *Biochemistry*, 30(35), pp.8671–8678.
- Ikeda, M. et al., 1999. Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transketolase gene. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*.
- Isaza, J.P. et al., 2012. Whole genome shotgun sequencing of one Colombian clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis* reveals DosR regulon gene deletions. *FEMS microbiology letters*.
- Jamshidi, N. & Palsson, B.Ø., 2007. Investigating the metabolic capabilities of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using the in silico strain iNJ661 and proposing alternative drug targets. *BMC systems biology*, 1, p.26.
- Jansen, J.J. et al., 2004. Analysis of longitudinal metabolomics data. *Bioinformatics*, 20(15), p.2438.
- Jelakovic, S. et al., 2003. Structure and catalytic mechanism of the cytosolic D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase from rice. *Journal of molecular biology*, 326(1), pp.127–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12547196> [Accessed July 14, 2015].
- Johnson, J.D., Muhonen, W.W. & Lambeth, D.O., 1998. Characterization of the ATP- and GTP-specific Succinyl-CoA Synthetases in Pigeon: THE ENZYMES INCORPORATE THE SAME -SUBUNIT. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), pp.27573–27579.
- de Jong, B.C. et al., 2008. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia. *The Journal of infectious diseases*, 198(7), pp.1037–43.
- Joyce, M.A. et al., 2012. Biochemical and structural characterization of the GTP-preferring succinyl-CoA synthetase from *Thermus aquaticus*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 68(Pt 7), pp.751–62.
- Junker, B.H., Klukas, C. & Schreiber, F., 2006. VANTED: a system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC bioinformatics*, 7(1), p.109.
- Kanehisa, M. et al., 2006. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), pp.D354-7.
- Karp, P.D. et al., 2005. Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. *Nucleic acids research*, 33(19), pp.6083–9.
- Karp, P.D. et al., 2010. Pathway Tools version 13.0: integrated software for pathway/genome informatics and systems biology. *Briefings in bioinformatics*, 11(1), pp.40–79.
- Kato-Maeda, M. & Bifani, P., 2001. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical*, 107(5), pp.533–537.
- Kelkar, D.S. et al., 2011. Proteogenomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* by high

- resolution mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10(12), p.M111.011627.
- Kelley-Loughnane, N. et al., 2002. Purification, kinetic studies, and homology model of *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1594(1), pp.6–16.
- Kitano, H., 2004. Biological robustness. *Nature Reviews Genetics*, 5(11), pp.826–837.
- Klamt, S. et al., 2003. FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 19(2), pp.261–269.
- Klamt, S., Julio, S.-R. & Gilles, E., 2007. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. *BMC systems biology*, 1.
- Kolly, G.S. et al., 2014. Assessing essentiality of transketolase in *Mycobacterium tuberculosis* using an inducible protein degradation system. *FEMS Microbiology Letters*, 358(1), pp.30–35.
- Krieger, I. V et al., 2012. Structure-guided discovery of phenyl-diketo acids as potent inhibitors of *M. tuberculosis* malate synthase. *Chemistry & biology*, 19(12), pp.1556–67.
- Kruger, N.J. & Ratcliffe, R.G., 2009. Insights into plant metabolic networks from steady-state metabolic flux analysis. *Biochimie*, 91(6), pp.697–702.
- Kurata, H. et al., 2007. Extended CADLIVE: a novel graphical notation for design of biochemical network maps and computational pathway analysis. *Nucleic acids research*, 35(20), p.e134.
- Larhlimi, A. et al., 2011. Robustness of metabolic networks: a review of existing definitions. *Bio Systems*, 106(1), pp.1–8.
- Lebioda, L., Stec, B. & Brewer, J.M., 1989. The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold beta + alpha-barrel with a novel beta beta alpha alpha (beta alpha)₆ topology. *Journal of Biological Chemistry*, 264(7), pp.3685–3693.
- Lee, J.M., Gianchandani, E.P. & Papin, J. a, 2006. Flux balance analysis in the era of metabolomics. *Briefings in bioinformatics*, 7(2), pp.140–50.
- Lei, B., 2000. Action Mechanism of Antitubercular Isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, Isolation, and characterization of InhA Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), pp.2520–2526.
- Leighty, R.W. & Antoniewicz, M.R., 2011. Dynamic metabolic flux analysis (DMFA): a framework for determining fluxes at metabolic non-steady state. *Metabolic engineering*, 13(6), pp.745–55.
- Leistikow, R.L. et al., 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *Journal of bacteriology*, 192(6), pp.1662–70.
- Lew, J. et al., 2013. Database resources for the tuberculosis community. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 93(1), pp.12–17.
- Lew, J.M. et al., 2011. TubercuList: 10 years after. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 91(1), pp.1–7.

- Liang, W. et al., 2011. Conversion of D-ribulose 5-phosphate to D-xylulose 5-phosphate: new insights from structural and biochemical studies on human RPE. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(2), pp.497–504. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923965> [Accessed July 14, 2015].
- Liu, K. et al., 2006. The phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Mycobacterium tuberculosis* induces strong cell-mediated immune responses in mice. *Molecular and cellular biochemistry*, 288(1–2), pp.65–71.
- Lonien, J. & Schwender, J., 2009. Analysis of metabolic flux phenotypes for two *Arabidopsis* mutants with severe impairment in seed storage lipid synthesis. *Plant physiology*, 151(3), pp.1617–34.
- Lüdemann, A. et al., 2004. PaVESy: Pathway Visualization and Editing System. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(16), pp.2841–4.
- Lugo de la Fuente, G., 2005. *Bacteriología médica*, Ediciones Cuéllar.
- Mahadevan, R. & Schilling, C.H., 2003. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metabolic Engineering*, 5(4), pp.264–276.
- Mai, X. & Adams, M.W.W., 1996. Characterization of a fourth type of 2-keto acid-oxidizing enzyme from a hyperthermophilic archaeon: 2-Ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. *Journal of Bacteriology*, 178(20), pp.5890–5896.
- Malik, A.N.J. & Godfrey-Faussett, P., 2005. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. *The Lancet infectious diseases*, 5(3), pp.174–83.
- Manish, S., Venkatesh, K. & Banerjee, R., 2007. Metabolic flux analysis of biological hydrogen production by *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(16), pp.3820–3830.
- Matsuda, F., Wakasa, K. & Miyagawa, H., 2007. Metabolic flux analysis in plants using dynamic labeling technique: application to tryptophan biosynthesis in cultured rice cells. *Phytochemistry*, 68(16–18), pp.2290–301.
- Matte, A. et al., 1997. Structure and Mechanism of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13), pp.8105–8108.
- Mawuenyega, K.G. et al., 2005. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Molecular biology of the cell*, 16(1), pp.396–404.
- McKinney, J.D. et al., 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406(6797), pp.735–8.
- Mizrahi, V. & Andersen, S.J., 1998. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Molecular microbiology*, 29(6), pp.1331–9.
- Mokrousov, I. et al., 2005. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome research*, 15(10),

pp.1357–64.

- Morohashi, M. et al., 2002. Robustness as a measure of plausibility in models of biochemical networks. *Journal of theoretical biology*, 216(1), pp.19–30.
- Movahedzadeh, F. et al., 2004. The *Mycobacterium tuberculosis* Rv1099c gene encodes a GlpX-like class II fructose 1, 6-bisphosphatase. *Microbiology*, 150(Pt 10), pp.3499–505.
- Muñoz-Elías, E.J. et al., 2006. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Molecular microbiology*, 60(5), pp.1109–22.
- Muñoz-Elías, E.J. & McKinney, J.D., 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular microbiology*, 8(1), pp.10–22.
- Muñoz-Elías, E.J. & McKinney, J.D., 2005. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nature medicine*, 11(6), pp.638–44.
- Nakazawa, M. et al., 2011. Characterization of a bifunctional glyoxylate cycle enzyme, malate synthase/isocitrate lyase, of *Euglena gracilis*. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 58(2), pp.128–33.
- Nakazawa, M. et al., 2005. Molecular characterization of a bifunctional glyoxylate cycle enzyme, malate synthase/isocitrate lyase, in *Euglena gracilis*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 141(4), pp.445–52.
- Niklas, J., Noor, F. & Heinzle, E., 2009. Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line Hep G2. *Toxicology and applied pharmacology*, 240(3), pp.327–36.
- Niklas, J., Schneider, K. & Heinzle, E., 2010. Metabolic flux analysis in eukaryotes. *Current opinion in biotechnology*, 21(1), pp.63–9.
- Oberhardt, M. a et al., 2008. Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 190(8), pp.2790–803.
- Oberhardt, M. a et al., 2010. Metabolic network analysis of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic cystic fibrosis lung infection. *Journal of bacteriology*, 192(20), pp.5534–48.
- Papin, J.A. et al., 2003. Metabolic pathways in the post-genome era. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), pp.250–258.
- Papin, J. a et al., 2002. The genome-scale metabolic extreme pathway structure in *Haemophilus influenzae* shows significant network redundancy. *Journal of theoretical biology*, 215(1), pp.67–82.
- Park, J., Kim, T. & Lee, S., 2009. Constraints-based genome-scale metabolic simulation for systems metabolic engineering. *Biotechnology advances*, 27(6), pp.979–988.
- Park, Y.J. et al., 2006. Purifications and characterizations of a ferredoxin and its related 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* PI. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(1), pp.46–54.

- Phong, W.Y. et al., 2013. Characterization of phosphofructokinase activity in *Mycobacterium tuberculosis* reveals that a functional glycolytic carbon flow is necessary to limit the accumulation of toxic metabolic intermediates under hypoxia. *PLoS one*, 8(2), p.e56037.
- Pitkänen, J.-P. et al., 2003. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. *Metabolic Engineering*, 5(1), pp.16–31.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A., 2001. *Microbiologia* 5ta edicio., McGraw - Hill.
- Price, N.D., Papin, J.A. & Palsson, B.O., 2002. Determination of redundancy and systems properties of the metabolic network of *Helicobacter pylori* using genome-scale extreme pathway analysis. *Genome Research*, 12(5), pp.760–769.
- Puchałka, J. et al., 2008. Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS computational biology*, 4(10), p.e1000210.
- Quartararo, C.E. et al., 2013. Structural, kinetic and chemical mechanism of isocitrate dehydrogenase-1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 52(10), pp.1765–75.
- Raman, K., Rajagopalan, P. & Chandra, N., 2005. Flux balance analysis of mycolic acid pathway: targets for anti-tubercular drugs. *PLoS computational biology*, 1(5), p.e46.
- Ramsaywak, P.C. et al., 2004. Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*--a novel Class II A tetramer. *Protein expression and purification*, 37(1), pp.220–8.
- Reddy, T.B.K. et al., 2009. TB database: an integrated platform for tuberculosis research. *Nucleic acids research*, 37, pp.D499-508.
- Reed, J.L. & Palsson, B., 2004. Genome-scale in silico models of *E. coli* have multiple equivalent phenotypic states: Assessment of correlated reaction subsets that comprise network states. *Genome Research*, 14(9), pp.1797–1805.
- Rhee, K.Y. et al., 2011. Central carbon metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: an unexpected frontier. *Trends in microbiology*, 19(7), pp.307–14.
- Roessner, U. et al., 2000. Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 23(1), pp.131–42.
- Rukseree, K., Thammarongtham, C. & Palittapongarnpim, P., 2008. One-step purification and characterization of a fully active histidine-tagged Class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(7), pp.500–506.
- Sassetti, C.M., Boyd, D.H. & Rubin, E.J., 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Molecular microbiology*, 48(1), pp.77–84.
- Sassetti, C.M. & Rubin, E.J., 2003. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), pp.12989–94.
- Scheer, M. et al., 2011. BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic acids*

- research, 39(Database issue), pp.D670-6.
- Schellenberger, J. et al., 2011. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature protocols*, 6(9), pp.1290–307.
- Schnappinger, D. et al., 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages : Insights into the Phagosomal Environment. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(5).
- Schuster, S., 1999. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends in Biotechnology*, 17(2), pp.53–60. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779998012906> [Accessed October 23, 2015].
- Schuster, S. et al., 2001. Use of network analysis of metabolic systems in bioengineering. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(6), pp.363–372.
- Schuster, S. & Hilgetag, C., 1994. On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *Journal of Biological Systems*, 2(2), pp.165–182. Available at: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0218339094000131> [Accessed November 28, 2015].
- Schweizer, E. & Hofmann, J., 2004. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiology and molecular biology ...*, 68(3).
- Shi, L. et al., 2010. Carbon flux rerouting during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. *Molecular microbiology*, 78(5), pp.1199–215.
- Shi, L. et al., 2005. Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under in vitro conditions affecting aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), pp.15629–15634.
- Shi, W. et al., 2011. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science (New York, N. Y.)*, 333(6049), pp.1630–2.
- Singh, V.K. & Ghosh, I., 2006. Kinetic modeling of tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass in *Mycobacterium tuberculosis*, and its application to assessment of drug targets. *Theoretical biology & medical modelling*, 3, p.27.
- Smedsgaard, J. & Nielsen, J., 2005. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *Journal of experimental botany*, 56(410), pp.273–86.
- Smith, C. V et al., 2003. Biochemical and structural studies of malate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry*, 278(3), pp.1735–43.
- Smith, I., 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), pp.463–496.
- Snoep, J.L. & Olivier, B.G., 2002. Java Web Simulation (JWS); a web based database of kinetic models. *Molecular biology reports*, 29(1–2), pp.259–63.
- Steck, P.A. et al., 1978. Mycolic acids. A reinvestigation. *J. Biol. Chem.*, 253(16),

- pp.5625–5629.
- Stelling, J. et al., 2002. Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature*, 420(6912), pp.190–193.
- Stephanopoulos, G., Aristidou, A.A. & Nielsen, J., 1998. *Metabolic engineering: principles and methodologies* 1st editio., San Diego: Academic Press.
- Takayama, K., Wang, C. & Besra, G.S., 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, 18(1), pp.81–101.
- Takayama, K., Wang, L. & David, H.L., 1972. Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2(1), pp.29–35.
- Thiele, I. et al., 2010. Functional characterization of alternate optimal solutions of *Escherichia coli*'s transcriptional and translational machinery. *Biophysical Journal*, 98(10), pp.2072–2081.
- Varma, A. & Palsson, B.O., 1994. Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use. *Bio/technology*, 12.
- Vass, M.T. et al., 2006. The JigCell model builder: a spreadsheet interface for creating biochemical reaction network models. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics / IEEE, ACM*, 3(2), pp.155–64.
- Verhees, C.H. et al., 2002. Molecular and Biochemical Characterization of a Distinct Type of Fructose-1,6-Bisphosphatase from *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*, 184(12), pp.3401–3405.
- Vilchèze, C. et al., 2000. Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FAS I end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 182(14), pp.4059–67.
- Voskuil, M., Visconti, K. & Schoolnik, G., 2004. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis*, pp.218–227.
- Voskuil, M.I. et al., 2011. The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Frontiers in microbiology*, 2(May), p.105.
- Warner, D.F. & Mizrahi, V., 2007. The survival kit of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature medicine*, 13(3), pp.282–4.
- Weckwerth, W., 2003. Metabolomics in systems biology. *Annual review of plant biology*, 54, pp.669–89.
- Weitzel, M. et al., 2013. 13CFLUX2--high-performance software suite for (13)C-metabolic flux analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(1), pp.143–5.
- WHO, 2015. *WHO | Global tuberculosis control 2015*, Elsevier.
- WHO, 2010. *WHO | Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB)*,
- Wynn, J.P., Hamid, A.B.A. & Ratledge, C., 1999. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology*, 145(8), pp.1911–1917.

- Wynn, J.P. & Ratledge, C., 1997. Malic enzyme is a major source of NADPH for lipid accumulation by *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 143(1), pp.253–257.
- Yang, J. et al., 2014. Expression, purification, and characterization of NADP⁺-dependent malic enzyme from the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(7), pp.1849–57.
- Yoon, K.I.S. et al., 1996. Purification and characterization of 2-oxoglutarate: Ferredoxin oxidoreductase from a thermophilic, obligately chemolithoautotrophic bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Journal of Bacteriology*, 178(11), pp.3365–3368.
- Yugi, K. et al., 2005. Hybrid dynamic/static method for large-scale simulation of metabolism. *Theoretical biology & medical modelling*, 2.
- Zamboni, N. et al., 2009. (13)C-based metabolic flux analysis. *Nature protocols*, 4(6), pp.878–92.
- Zamboni, N., Fischer, E. & Sauer, U., 2005. FiatFlux: a software for metabolic flux analysis from 13C-glucose experiments. *BMC bioinformatics*, 6(1), p.209.
- Zamorano, F., Wouwer, a Vande & Bastin, G., 2010. A detailed metabolic flux analysis of an underdetermined network of CHO cells. *Journal of biotechnology*, 150(4), pp.497–508.
- Zhang, Y. & Mitchison, D., 2003. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 7(1), pp.6–21.
- Zhao, X. et al., 2014. Enzymatic characterization of a type II isocitrate dehydrogenase from pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Lai strain 56601. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(1), pp.487–96.
- Zimhony, O. et al., 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature medicine*, 6(9), pp.1043–7.